

Homogeneous, recombinant immune interferon fragments

Publication number: AT393690B

Publication date: 1991-11-25

Inventor:

Applicant: HOFFMANN LA ROCHE (CH)

Classification:

- international:

C07K14/555; C07K14/57; C12N1/21; C12N15/23;
C12N15/70; A61K38/00; C07K14/435; C12N1/21;
C12N15/19; C12N15/70; A61K38/00; (IPC1-7):
A61K37/66; C12N1/20; C12N15/23; C12P21/02

- European:

C07K14/555; C07K14/57; C12N15/70

Application number: AT19870002644 19871008

Priority number(s): AT19870002644 19871008

Report a data error here

Abstract of AT393690B

The present invention relates to homogeneous, recombinant, human interferon fragments which, by comparison with a mature, full-length, recombinant, human immune interferon, lack 6 to 11 amino acids at the C terminus, to replicable, microbial expression vectors with a nucleotide sequence encoding a recombinant, human immune interferon fragment, and to microorganisms which are transformed with such an expression vector. The invention further relates to processes for the preparation of the homogeneous, recombinant, human immune interferon fragments and of the abovementioned microorganisms. In addition to this, the invention relates to pharmaceutical compositions which contain the said interferon fragments, and to the use of these recombinant immune interferon fragments and of the pharmaceutical compositions for treating various diseases.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19)



Republik
Österreich
Patentamt

(11) Nummer: AT 393 690 B

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 2644/87

(22) Anmeldetag: 8.10.1987

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 5.1991

(45) Ausgabetag: 25.11.1991

(51) Int.Cl.⁵ : C12N 15/23
C12N 1/20, C12P 21/02, A61K 37/66

(56) Entgegenhaltungen:

EP-A2 146354 EP-A1 170917 EP-A2 166993 EP-A2 147175

(73) Patentinhaber:

F.HOFFMANN-LA ROCHE AG
CH-4002 BASEL (CH).

(54) HOMOGENE, REKOMBINANTE IMMUN-INTERFERONFRAGMENTE

(57) Die vorliegende Erfindung betrifft homogene, rekombinante, menschliche Interferonfragmente, denen im Vergleich zu einem reifen, rekombinanten, menschlichen Immun-Interferon voller Länge 6 bis 11 Aminosäuren am C-Terminus fehlen, replizierbare, mikrobielle Expressionsvektoren mit einer ein rekombinantes, menschliches Immun-Interferonfragmenta kodierenden Nukleotidsequenz und Mikroorganismen, die mit einem solchen Expressionsvektor transformiert sind. Im weiteren betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung der homogenen, rekombinanten, menschlichen Immun-Interferonfragmente und der oben erwähnten Mikroorganismen. Zusätzlich dazu betrifft die Erfindung pharmazeutische Zusammensetzungen, die die genannten Interferonfragmente enthalten, und die Verwendung dieser rekombinanten Immun-Interferonfragmente und der pharmazeutischen Zusammensetzungen zur Behandlung verschiedener Krankheiten.

AT 393 690 B

Die vorliegende Erfindung betrifft homogene, rekombinante, menschliche Immun-Interferonfragmente, denen im Vergleich zum reifen, rekombinanten, menschlichen Immun-Interferon voller Länge 6 bis 11 Aminosäuren am C-Terminus fehlen. (Die Aminosäuresequenz des Immun-Interferons voller Länge ist in Fig. 1 dargestellt). Die Erfindung betrifft auch replizierbare, mikrobielle Expressionsvektoren, die eine Nukleotidsequenz enthalten, die für ein solches rekombinantes Immun-Interferonfragment kodiert, mit diesem Expressionsvektoren transformierte Mikroorganismen und Verfahren zur Herstellung dieser Interferonfragmente und Mikroorganismen. Die Erfindung betrifft im weiteren Pharmazeutika, die eine oder mehrere dieser rekombinanten Immun-Interferonfragmente enthalten, und die Verwendung dieser rekombinanten Immun-Interferonfragmente und Pharmazeutika zur Behandlung verschiedener Krankheiten.

Natürliches, menschliches Immun-Interferon (IFN- γ) wird bei mitogener Stimulierung von Lymphozyten erzeugt. Es zeigt antivirale und anti-proliferative Wirkung, die aber bei pH 2 verloren geht. Die aktive Form des Immun-Interferons ist vermutlich ein Multimer, sehr wahrscheinlich ein Dimer, Trimer oder Tetramer (Pestka et al., J. Biol. Chem. 258, 4706-4709 [1983]).

Man fand, daß Immun-Interferon im menschlichen Genom in einem, ein 166 Aminosäures langes Vorläuferpolypeptid kodierendes Gen verschlüsselt ist (Derynck et al., Nucleic Acid Res. 10, 3605-3615 [1982]). Man nahm an, daß es durch posttranslationale Prozessierung in ein Polypeptid mit 146 Aminosäuren und einer Cys-Tyr-Cys-Gln-...N-terminalen Sequenz überführt wird.

Durch Verwendung von Methoden der DNA-Rekombinationstechnologie (z. B. Maniatis et al., „Molecular cloning - A laboratory manual“, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982) wurden Expressionsvektoren, die für ein rekombinantes, diese 146 Aminosäuren umfassendes Immun-Interferon kodieren, konstruiert. Bei Einführung dieser Expressionsvektoren in einen mikrobiellen Wirt, werden rekombinante Immun-Interferonpolypeptide mit 147 Aminosäuren, nämlich den oben erwähnten 146 Aminosäuren sowie einem zusätzlichen N-terminalen Methionin, synthetisiert. Das zusätzliche Methionin stammt vom Translationsstartsignal AUG der mRNA, das für die Aminosäure Methionin kodiert. Im ursprünglichen menschlichen Gen ist dieses Translationsstartsignal vor dem Signalpeptid gelegen. Während der posttranslationalen Prozessierung wird das Signalpeptid, zusammen mit dem vom Translationsstartsignal stammenden Methionin, abgespalten, was zu einem methioninfreien, reifen, 146 Aminosäure langen Immun-Interferon führt. Prokaryotische Wirtszellen können das Signalpeptid vor dem menschlichen Immun-Interferonvorläuferpolypeptid nicht an der richtigen Stelle abspalten. Deshalb muß die im menschlichen Immun-Interferongen für das Signalpeptid kodierende Sequenz mittels gentechnischer Methoden entfernt werden, damit das Immun-Interferon in reifer Form exprimiert werden kann. Das ATG-Kodon, genau vor der für das reife Polypeptid kodierenden Sequenz, hat das im rekombinanten, menschlichen Immun-Interferon vorhandene Methionin zur Folge. Trotz des zusätzlichen N-terminalen Methionins und der Tatsache, daß es nicht glykosyliert ist, zeigt das rekombinante Immun-Interferon antivirale und anti-proliferative Wirkung die pH 2 empfindlich ist und vergleichbar ist mit derjenigen des aus menschlichen Leukozyten isolierten Immun-Interferons (Gray et al., Nature 295, 503-508 [1982]). Später zeigten Rinderknecht et al., (J. Biol. Chem. 259, 6790-6797 [1984]), daß das, aus induzierten menschlichen Lymphozyten aus dem peripheren Blut gereinigte, Immun-Interferon ein 143 Aminosäure langes Polypeptid ist, dem die Cys-Tyr-Cys-Sequenz fehlt und das einen Proglutaminsäurerest am N-Terminus hat. Am C-Terminus wurde eine gewisse Heterogenität beobachtet. Nochmalige Klonierung des ursprünglichen, rekombinanten Immun-Interferon-Gens führte zu Expressionsvektoren, die für reife, rekombinante Immun-Interferon kodieren, das diese 143 Aminosäuren umfaßt und über ein, wie oben dargelegt, zusätzliches Methionin am N-Terminus verfügt. Ein Vergleich der biologischen Aktivitäten der rekombinanten, menschlichen Immun-Interferone mit oder ohne die Cys-Tyr-Cys-Sequenz zeigte, daß die Entfernung der Cys-Tyr-Cys-Sequenz zu einer zweifach höheren viralen Aktivität führt. (EP-A2-146 354, veröffentlicht am 26. 6. 85). Darüberhinaus ist in der EP-A 146 354 gezeigt, daß Immun-Interferonfragmente, die durch begrenzte tryptische Spaltung von reifem, rekombinanten, menschlichem Immun-Interferon erzeugt wurden, im Vergleich zu einer, aus einer Mischung von Interferonpolypeptiden (= Referenzmaterial) mit 139 bzw. 143 Aminosäuren (Verhältnis 98:2) bestehenden, rekombinanten Immun-Interferonpräparation verminderte antivirale Aktivität hatten. Zum Beispiel zeigte ein 131 Aminosäure langes Fragment, dem 12 Aminosäuren am C-Terminus fehlen, 40-50 % der spezifischen Aktivität des oben genannten Referenzmaterials. Fragmente, denen zusätzlich weitere 3 bzw. 6 Aminosäuren am C-Terminus entfernt worden waren, die also 129 bzw. 125 Aminosäure lang waren, hatten 6-9 bzw. 1 % der spezifischen Aktivität des Referenzmaterials. Daraus haben die Verfasser der oben genannten Veröffentlichung geschlossen, daß alle Fragmente, denen terminale Aminosäure fehlen, eine niedrigere antivirale Aktivität als das oben erwähnte Referenzmaterial oder das reife, rekombinante menschliche Immuninterferon mit 143 Aminosäuren, dem die Cys-Tyr-Cys-Sequenz am N-Terminus fehlt, haben und daß die Aktivität umso niedriger wird, je mehr Aminosäuren am C-Terminus fehlen. Es werden daher in Anspruch 3 der EP-A2-146 354 Immuninterferon-Fragmente mit 126 bis 142 Aminosäuren sowie das Immuninterferon voller Länge mit 143 Aminosäuren beansprucht, offensichtlich in der Annahme, daß diese alle eine Aktivität von mehr als 1 % im Vergleich zum oben genannten Referenzmaterial

aufweisen. (Das Immun-Interferonfragment mit 125 Aminosäuren hat - wie erwähnt - 1 % Aktivität.)

Im Patentanspruch 20 der EP-A2-146354 werden dann in einer Aufzählung die Immuninterferon-Fragmente mit einer Länge von 132 bis 139 Aminosäuren explizit beansprucht; wie aus der Rückbeziehung auf den Patentanspruch 15 hervorgeht, spezifizieren die Verfasser der europäischen Patentanmeldung damit, daß diese Immuninterferon-Fragmente dieselben Eigenschaften wie natives Immuninterferon haben. Sie spezifizieren offensichtlich deshalb damit, weil das Immuninterferon-Fragment mit 131 Aminosäuren 40-50 % der spezifischen Aktivität der Mischung von Interferonpolypeptiden mit 139 bzw. 143 Aminosäuren (Verhältnis 98:2) aufweisen. MaW: Von den Immuninterferon-Fragmenten, die im Patentanspruch 20 aufgezählt sind, wurde nur ein einziges - nämlich das mit 139 Aminosäuren - tatsächlich hergestellt, und auch das nur in einer Mischung mit dem Immuninterferon voller Länge. Was die anderen Immuninterferonfragmente betrifft, so handelt es sich dabei um eine reine Spekulation, um eine rein „papierene“ Offenbarung; es sind die Eigenschaften dieser Fragmente nicht bekannt, und es ist auch nicht möglich diese Fragmente aufgrund der Offenbarung der EP-A2-146354 herzustellen, diese Immuninterferonfragmente sind daher im patentrechtlichen Sinne neu. (Vgl. in diesem Zusammenhang die ständige österreichische Praxis, wonach in Patentanmeldungen Beispiele für erfindungsgemäße chemische Verbindungen, die nur aus einer chemischen Formel bestehen, ersatzlos gestrichen werden, wenn nicht deren tatsächliche Herstellung z. B. durch Angabe des Schmelzpunktes belegt ist; denn die Angabe einer chemischen Formel allein kann die Neuheit des chemischen Stoffes, der diese Formel hat, nicht treffen. Vergleiche in diesem Zusammenhang auch die Entscheidung des Europäischen Patentamtes vom 26. 3. 1986, ABl. EPA 1/1987, 5.)

Die wenigen tatsächlich hergestellten Immun-Interferonfragmente wurden nur durch begrenzte Trypsinspaltung erzeugt. Trypsin katalysiert die Hydrolyse von Peptidbindungen, deren Carbonylgruppe von basischen Aminosäuren, üblicherweise Arginin oder Lysin, zur Verfügung gestellt wird. Die Aminosäure-Sequenz von Immun-Interferon enthält 20 Lysin- und 8 Argininreste. Die Anzahl der individuellen, durch Trypsin erzeugten Fragmente hängt von der Zugänglichkeit der Peptidbindung, die zur Erzeugung des Fragmentes geschnitten werden muß, ab. Nichtsdestoweniger führt begrenzte Protolyse zu einem großen Spektrum an Fragmenten, und die Reingung eines bestimmten Fragmentes aus einer solchen Mischung zur Homogenität ist sehr problematisch, insbesondere, da Polypeptide mit im wesentlichen gleicher Aminosäuresequenz, aber mit um wenige Aminosäuren unterschiedlicher Länge zu trennen wären. Unter diesen Umständen ist die Trennung mittels HPLC, wie sie in der EP-A2-146354 beschrieben ist, zur Reinigung der hier exemplifizierten Immun-Interferonfragmente zur Homogenität, d. h. im wesentlichen frei von anderen, sich in der Größe davon unterscheidenden Interferonfragmenten, nicht geeignet. Zudem können die erfindungsgemäßen Immun-Interferonfragmente, die über nicht-basische C-terminale Aminosäuren wie Serin, Glutamin, Methionin, Leucin oder Phenylalanin verfügen, auf Grund der Spezifität von Trypsin nicht durch tryptische Spaltung erzeugt werden. Das mag der Grund dafür sein, daß nur die Herstellung von Immun-Interferonfragmenten mit 125, 129, 131 und 139 Aminosäuren, die entweder Lysin oder Arginin als C-terminale Aminosäuren haben, in den Beispielen der EP-A2-146354 gezeigt ist. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurden nun erstmals Immun-Interferonfragmente der eingangs genannten Art hergestellt, denen erfindungsgemäß 6 bis 11 Aminosäuren fehlen. Es handelt sich dabei also um rekombinante, menschliche Immun-Interferonfragmente mit 132 bis 137 Aminosäuren, gezählt ab dem ersten Glutaminrest der auf Fig. 1 gezeigten Aminosäuresequenz, die zum ersten Mal in homogener Form unter Verwendung der in der vorliegenden Erfindung beschriebenen Methoden hergestellt wurden. Diese Fragmente sind als gezielte Auswahl gegenüber dem allgemeinen Bereich, der im Patentanspruch 3 der EP-A2-0146354 beansprucht ist, neu. Die im Patentanspruch 20 dieser EP-A2-0146354 angeführten Fragmente gehören - mit Ausnahme des letzten - im patentrechtlichen Sinn nicht zum Stand der Technik, wie weiter oben bereits angeführt. Überraschenderweise wurde gefunden, daß diese homogenen, rekombinanten Immun-Interferonfragmente über eine im Vergleich zum reifen rekombinanten Immun-Interferon voller Länge erhöhte spezifische antivirale Aktivität verfügen. Gleichermaßen wurde beobachtet, daß die anderen für Immun-Interferon typischen, biologischen Aktivitäten bei den erfindungsgemäßen rekombinanten Immun-Interferonfragmenten im Vergleich zum reifen rekombinanten Immun-Interferon erhöht sind. Die erfindungsgemäßen Immun-Interferonfragmente sind daher auch erfindungsgemäß neu. Pharmazeutika, welche eines oder mehrere der erfindungsgemäßen rekombinanten Immun-Interferonfragmente enthalten, können zur Behandlung verschiedener Krankheiten verwendet werden. Beispiele für solche Krankheiten sind: virale Infektionen, neoplastische Krankheiten oder rheumatische Arthritis.

Die vorliegende Erfindung stellt deshalb homogene, rekombinante Immun-Interferonfragmente, denen im Vergleich zum reifen, rekombinanten, menschlichen Immun-Interferon 6-11 Aminosäuren am C-Terminus fehlen, zur Verfügung. Genauer gesagt werden durch die Erfindung homogene, rekombinante Immun-Interferonfragmente mit der Aminosäuresequenz

5 X-Y-Asp-Pro-Tyr-Val-Lys-Glu-Ala-Glu-Asn-Leu-Lys-Lys-Tyr-Phe-
 Asn-Ala-Gly-His-Ser-Asp-Val-Ala-Asp-Asn-Gly-Thr-Leu-Phe-Leu-
 Gly-Ile-Leu-Lys-Asn-Trp-Lys-Glu-Glu-Ser-Asp-Arg-Lys-Ile-Met-
 10 Gln-Ser-Gln-Ile-Val-Ser-Phe-Tyr-Phe-Lys-Leu-Phe-Lys-Asn-Phe-
 Lys-Asp-Asp-Gln-Ser-Ile-Gln-Lys-Ser-Val-Glu-Thr-Ile-Lys-Glu-
 Asp-Met-Asn-Val-Lys-Phe-Phe-Asn-Ser-Asn-Lys-Lys-Lys-Arg-Asp-
 Asp-Phe-Glu-Lys-Leu-Thr-Asn-Tyr-Ser-Val-Thr-Asp-Leu-Asn-Val-
 15 Gln-Arg-Lys-Ala-Ile-His-Glu-Leu-Ile-Gln-Val-Met-Ala-Glu-Leu-
 Ser-Pro-Ala-Ala-Lys-Thr-Gly-Lys-Arg-Lys-Arg-Z,

wobei entweder X für Methionin und Y für Glutamin oder X für Wasserstoff und Y für Glutamin oder Pyroglutaminsäure und Z für

15 Ser,
 Ser-Gln,
 Ser-Gln-Met,
 Ser-Gln-Met-Leu,
 20 Ser-Gln-Met-Leu-Phe oder
 Ser-Gln-Met-Leu-Phe-Arg

steht, zur Verfügung gestellt.

Diese homogenen, rekombinanten Immun-Interferonfragmente verfügen über eine deutlich höhere biologische Aktivität im Vergleich zu reifem, rekombinantem, menschlichem Immun-Interferon, d. h. zu einem rekombinanten Immun-Interferon voller Länge mit 143 Aminosäuren, das entweder Glutamin oder ein Pyroglutamat an Position 1 seiner Aminosäure-Sequenz hat. Ist die Aminosäure an Position 1 Glutamin kann das rekombinante Immun-Interferon über ein zusätzliches Methionin als 144-igste Aminosäure am N-Terminus verfügen. Das zusätzliche Methionin stammt von dem Translationsstartsignal AUG der mRNA, das, wie oben ausgeführt, für die Aminosäure Methionin kodiert. In Expressionssystemen wie E. coli wird dieses Methionin nicht immer durch Prozessierung entfernt. Man fand, daß das zusätzliche N-terminale Methionin die biologische Aktivität der meisten rekombinanten Polypeptide nicht beeinträchtigt (Winnacker, in „Gene und Klone“, p. 255, VCH, Weinheim, Deutschland [1985]). Nach Entfernen des N-terminalen Methionins von rekombinantem Immun-Interferon oder seiner Fragmente kann das neu entstandene Glutamin zu Pyroglutamacyclisieren, wobei man glaubt, daß wiederum keine Beeinträchtigung der biologischen Aktivität erfolgt. Die rekombinanten Immun-Interferonfragmente der vorliegenden Erfindung können als Multimere, bevorzugt als Dimere, Trimere oder Tetramere vorliegen.


Es wurde festgestellt, daß sie normalerweise unter nicht-denaturierenden Bedingungen als Dimere vorliegen, obwohl sie nicht glykosyliert sind und auch mangels Cysteinresten keine S-S-Brücken bilden können. Die Dimerisierung scheint auf nicht-kovalente Wechselwirkungen zurückzuführen zu sein. Es konnte experimentell gezeigt werden, daß das Immun-Interferonfragment IFN- γ -(10) auf Gelpemationsssäulen unter nicht-denaturierenden Bedingungen eine Mobilität aufweist wie ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 30 bis 32 kDa.


Die rekombinanten Immun-Interferonfragmente der vorliegenden Erfindung können zur Herstellung von Pharmazeutika verwendet werden. Diese enthalten einen physiologisch verträglichen Träger sowie eine, im Vergleich zur Menge, reifem, rekombinantem, menschlichem Immun-Interferon, die nötig ist, um eine im wesentlichen gleiche antivirale Aktivität zu erhalten, deutlich geringere Menge von besagten Immun-Interferonfragmenten. Solche Pharmazeutika sind nützlich zur Behandlung verschiedener Krankheiten. Es ist klar, daß Aminosäureaustausche, besonders solche einzelner Aminosäuren in den hierin offenbarten Immun-Interferonfragmenten, zu Varianten der rekombinanten Immun-Interferonfragmente führen können, welche über eine höhere spezifische Aktivität als reifes, rekombinantes, menschliches Immun-Interferon verfügen. Die Art und Weise, wie solche Aminosäureaustausche an einem rekombinanten Polypeptid durchgeführt werden, ist bekannt. Im allgemeinen Sinn umfaßt die vorliegende Erfindung alle rekombinanten Immun-Interferonfragmente, denen im Vergleich zu reifem, rekombinantem Immun-Interferon voller Länge 6 bis 11 Aminosäuren am C-Terminus fehlen oder Modifikationen und alleische Variante davon, wobei die Fragmente eine höhere biologische Aktivität als das reife rekombinante, menschliche Immun-Interferon voller Länge aufweisen. Die Erfindung stellt auch replizierbare, mikrobielle Expressionsvektoren, die eine für ein rekombinantes Immun-Interferonfragment kodierende, Nukleotidsequenz enthalten, die in funktioneller Art und Weise an eine Expressionskontrollsequenz gebunden ist, und mit so einem Expressionsvektor transformierte Mikroorganismen zur Verfügung. Darüberhinaus stellt sie pharmazeutische Zusammensetzungen, die eines oder mehrere rekombinante Immun-Interferonfragmente und einen physiologisch verträglichen Träger enthalten, zur


Verfügung. Die Erfindung bezieht sich im weiteren auf Verfahren zur Herstellung rekombinanter Immun-Interferonfragmente mittels DNA-Rekombinationstechnik, auf Verfahren zur Herstellung eines mit einem, wie oben erwähnten, replikablen, mikrobiellen Expressionsvektor transformierten Mikroorganismus und auf Methoden zur Herstellung pharmazeutischer Zusammensetzungen, die solche rekombinante Immun-Interferonfragmente enthalten. Im weiteren bezieht sich die Erfindung auf die Verwendung dieser Interferonfragmente und der entsprechenden Pharmazeutika zur Behandlung verschiedener Krankheiten.



Die Verständlichkeit der vorliegenden Erfindung wird durch die Bezugnahme auf die folgende ausführliche Beschreibung erleichtert, insbesondere in Verbindung mit den begleitenden Abbildungen, in denen die folgenden Abkürzungen und Zeichen verwendet werden:



B, E, H, S, Sa, Sc, X, Xb stehen für Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen: BamHI, EcoRI, HindIII, SphI, SalI, ScaI, XhoI und XbaI.

In den Figuren 2, 4 und 6 bis 9 werden Promotoren der Gene bla, lacI und neo dargestellt durch  ;

ribosomale Bindungsstellen der Gene bla, cat, neo und lacI werden dargestellt durch  ; Terminatoren

wie t_0 und T1 werden durch  dargestellt; das regulierbare Promotor/Operator-Element $P_{N25X/O}$ wird

durch  dargestellt; die ribosomale Bindungsstelle RBSII, SphI wird durch  dar-

gestellt; kodierende Regionen, die von dieser ribosomalen Bindungsstelle kontrolliert werden, sind dargestellt durch  ; Regionen, die zur Replikation der DNS (repl.) benötigt werden sind dargestellt durch  und Regionen die für Dihydrofolatreduktase (dhfr), Chloramphenicolacetyltransferase (cat), β -Lactamase (bla), den lac-Repressor (lacI), Neomycinphosphotransferase (neo)- und Interferon- γ (IFN- γ) kodieren sind dargestellt durch



Figur 1

Aminosäuresequenz und die sie kodierende Nukleotidsequenz des reifen, rekombinanten, menschlichen Immun-Interferons (iIFN- γ), dem die Cys-Tyr-Cys-Sequenz am N-Terminus fehlt. Die Hinfl-Schnittstelle, die zur Herstellung der, die rekombinanten Immun-Interferonfragmente codierenden, DNA-Fragmente benutzt wurde, ist unterstrichen. Das vom prokaryotischen Translationsstartsignal stammende Methionin ist eingeklammert.

Figur 2

Schematische Darstellung des Plasmids pDS8/RBSII, SphI.

Figur 3

Nukleotidsequenz des Xho/XbaI-Fragmentes des Plasmids pDS8/RBSII, SphI, das das regulierbare Promotor/Operator-Element $P_{N25X/O}$, die ribosomale Bindungsstelle RBSII, SphI, das dhfr-Gen, den Terminator t_0 , das cat-Gen und den Terminator T1 enthält. Die in Figur 2 bezeichneten Restriktionsendonukleaseschnittstellen sind überstrichen und die Region, die unter der Kontrolle von RBSII, SphI steht und für ein Dihydrofolatreduktasepolypeptid kodiert ist unterstrichen. Zusätzlich dazu ist die pBR322 Einheit von pDS8/RBSII, SphI schematisch dargestellt, wobei die angegebenen Zahlen sich auf die pBR322-Nukleotidsequenz beziehen (J. G. Sutcliffe, Cold Spring Harbor, Symp. Quant. Biol. 43, 77-90 [1979]).

Figur 4

Schematische Darstellung des Plasmids pDMI,1.

Figur 5

DNA-Sequenz des Plasmids pDM,1. Die in der Figur 4 angegebenen Restriktionsendonukleaseschnittstellen sind überstrichen und die für die Neomycinphosphotransferase (neo) und den lac-Repressor (lacI) kodierenden Regionen sind unterstrichen.

Figur 6

Schematische Darstellung des Aufbaus und der Isolierung des Fragmentes 1, das das Gen für reifes, rekombinantes, menschliches Immun-Interferon (iIFN- γ) enthält, ausgehend von dem Plasmid pRC23/IFI-900, das das, für ein rekombinantes, menschliches Interferon von 146 Aminosäuren, mit Cys-Tyr-Cys- als N-terminale Sequenz,

kodierende Gen enthält.

Einbau des Fragmentes 1 in pDS8/RBSII, SphI und der daraus resultierende Vektor pGLS. In der schematischen Zeichnung von pGLS wird mit (Sc) die Stelle angedeutet, an der das Fragment 1 mit der ScaI-Schnittstelle im Plasmid pDS8/RBSII, SphI verbunden ist.

Figur 8

Schematische Darstellung des Aufbaus der EcoRI-HindIII-Fragmente F(-6), F(-8) und F(-11), die für den C-Terminus von drei verschiedenen, rekombinanten Immun-Interferonfragmenten kodieren, unter Verwendung eines HinfI-Fragments von pGLS und der HinfI-HindIII-Adaptoren A(-6), A(-8) und A(-11). Die EcoRI-HindIII-Fragmente F(-7), F(-9) und F(-10) wurden in ähnlicher Weise unter Verwendung der HinfI-HindIII-Adaptoren

```

A(-7)  AGTCAGATGCTGTTTAA
        GTCTACGACAAAATTTCGA

A(-9)  AGTCAGATGTAA
        GTCTACATTTCGA

A(-10) AGTCAGTAA
        GTCATTTCGA

```

aufgebaut. Die zur Beendigung der Translation wichtigen Kodons in der Sequenz sind unterstrichen.

Figur 9

Schematische Darstellung des Einbaus der Fragmente F(-6), F(-8) und F(-11) in die EcoRI- und HindIII Schnittstellen von pDS8/RBSII, SphI, wodurch die Plasmide pIFN-γ(-6), pIFN-γ(-8) und pIFN-γ(-11) entstehen. Die Fragmente F(-7), F(-9) und F(-10) wurden in ähnlicher Weise eingebaut, wodurch die Plasmide pIFN-γ(-7), pIFN-γ(-9) und pIFN-γ(-10) entstanden.

Figur 10

Aminosäuresequenzen der Genprodukte rIFN-γ, IFN-γ(-6), IFN-γ(-7), IFN-γ(-8), IFN-γ(-9), IFN-γ(-10) und IFN-γ(-11), die durch die Expression von pGLS, pIFN-γ(-6), pIFN-γ(-7), pIFN-γ(-8), pIFN-γ(-9), pIFN-γ(-10) und pIFN-γ(-11) erhalten wurden. (130aa) steht für die 130 Aminosäuren von Position 1 bis Position 130 (siehe Figur 1).

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoretische Analyse des reifen, menschlichen Immun-Interferons und der menschlichen Interferonfragmente. Die Spuren (a), (b), (c) und (d) (Figur 11a, Teil A) und die Spuren (1) bis (9) (Figur 11b) zeigen Lysate von E. coli M15-Zellen, die pDMI,1 sowie einen der unten angegebenen Expressionsvektoren enthalten.

Expressionsvektor

Figur 11a

Figur 11b

pGLS-γ	a	1, 9
pIFN-γ(-4)	-	2
pIFN-γ(-5)	-	3
pIFN-γ(-6)	b	4
pIFN-γ(-8)	c	5
pIFN-γ(-9)	-	6
pIFN-γ(-10)	-	7
pIFN-γ(-11)	d	8

Die Spuren (a), (b), (c) und (d) (Figur 11a, Teil B) und die Spuren (10) bis (17) und (20) (Figur 11b) zeigen die gereinigten Interferonpolypeptide, die aus den in den Spuren (a), (b), (c) und (d) (Figur 11a, Teil A) und (1) bis (9) (Figur 11b) gezeigten Lysaten gereinigt wurden. Die durch limitierte Proteolyse hergestellten menschlichen Immun-Interferonfragmente IFN-γ(-14) und IFN-γ(-18) sind auf den entsprechenden Bahnen (18) und (19) gezeigt.

MW (Figur 11a) und M (Figur 11b) stehen für ein Gemisch von Markerproteinen (BIO-RAD Laboratories), das aus Proteinen mit Molekulargewichten von 14,4 kd, 21,5 kd, 31 kd, 45 kd, 66,2 kd und 92,5 kd (1 kd = 1000 Dalton) besteht.

Figur 12

Antivirale Aktivität in Beziehung zur C-terminalen Sequenz von IFN- γ . Die C-terminale Sequenz ist in dem von Dayhoff et al., („Atlas of Protein Sequence and Structure“, M. O. Dayhoff, ed., Vol. 5, p. 17, Natl. Biomed. Res. Found., Silver Spring, Maryland, U.S.A., [1979]) beschriebenen Ein-Buchstabenkode auf der Abszisse angegeben. Die antiviralen Aktivitäten der, auf der Abszisse durch die Anzahl der, im Vergleich zu reifem, rekombinantem, menschlichem Immun-Interferon (charakterisiert durch „O“), C-terminal abgespaltenen Aminosäuren charakterisierten, rekombinanten Immun-Interferonfragmente, sind auf der Ordinate dargestellt. Jeder Punkt steht für den geometrischen Mittelwert von wenigstens sechs voneinander unabhängigen Bestimmungen. Balken markieren die entsprechenden Grenzen bis zu 95%-iger Zuverlässigkeit der Meßwerte.

Figur 13

Vergleich der antiviralen Aktivität, der Aktivierung von Makrophagen und des Rezeptorbindungsvermögens bezüglich der C-terminalen Sequenz von IFN- γ (Einzelheiten entnehme man der Legende zu Figur 12 und dem Text). Die Werte der antiviralen Aktivität, der Aktivierung von Makrophagen und des Rezeptorbindungsvermögens der Immun-Interferonfragmente in Beziehung zu den entsprechenden Werten von reifem, rekombinantem Immun-Interferon, die willkürlich mit 1 festgelegt wurden, sind logarithmisch aufgetragen. Der absolute Wert der Aktivierung von Makrophagen durch reifes, rekombinantes Immun-Interferon beträgt 5×10^5 E/mg.

In einer gemäß der vorliegenden Erfindung bevorzugten Art und Weise können rekombinante Immun-Interferonfragmente durch Auswahl eines passenden Plasmids, das eine Kopie des vollständigen menschlichen Immun-Interferongens oder einer allelischen Variante davon enthält, hergestellt werden. Translationsstopcodons können dann, in der für den C-Terminus von Immun-Interferon kodierenden Region des Gens, durch gezielte Mutagenese („site directed mutagenesis“), wie sie von Smith et al. (in „Genetic Engineering“ 3, 1-32 [1981], J. K. Setlow, A. Hollaender eds., Plenum Press, New York) beschrieben ist, oder durch Entfernen eines passenden Restriktionsfragmentes aus dieser Region und dessen Ersatz durch ein synthetisches Stück DNA, das für den gewünschten C-Terminus des rekombinanten Immun-Interferonfragments kodiert, eingeführt werden. Bei der letzteren Methode werden bevorzugt zwei verschiedene Restriktionsendonukleasen verwendet, um das Ausgangsplasmid zu schneiden, damit zwei verschiedene, aneinander haftende Enden entstehen. Die synthetische DNA mit den überlappenden Enden kann dann gleich in der richtigen Orientierung eingepaßt werden. In einem nächsten Schritt kann die für das rekombinante Immun-Interferonfragment kodierende DNS-Sequenz, in einen replizierbaren, mikrobiellen Expressionsvektor, der einen Replikationsursprung, einen Promotor oder einen Promotor-Operator und eine, für eine ribosomale Bindungsstelle (RBS) kodierende Sequenz enthält, eingesetzt werden. Geeignete replizierbare Expressionsvektoren findet man in Maniatis et al. (supra) oder in den Beispielen der vorliegenden Erfindung. Bevorzugt sind replizierbare Expressionsvektoren, die eine, ein rekombinantes Immun-Interferonfragment kodierende, Nukleotidsequenz enthalten, die funktionell mit einer Expressionskontrollsequenz verbunden sind. Beispiele solcher Expressionsvektoren sind pIFN- γ (-6), pIFN- γ (-7), pIFN- γ (-8), pIFN- γ (-9), pIFN- γ (-10) und pIFN- γ (-11), in denen die für die rekombinanten Immun-Interferonfragmente kodierende Sequenz in den Expressionsvektor pDS8/RBSII, SphI (Figur 2) integriert ist. Der Expressionsvektor pDS8/RBSII, SphI wurde in E. coli M15 (pDM1,1), einem E. coli Stamm (E. coli DZ291), eingeführt, der mit dem den lac-Repressor codierenden Plasmid pDM1,1 (Figur 4) transformiert ist. Der daraus hervorgehende E. coli-Stamm M15 (pDS8/RBSII, SphI; pDM1,1) wurde am 6. August 1986 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSM) mit der Hinterlegungsnummer DSM 3809 hinterlegt. Die Methoden zum Aufbau der Expressionsvektoren, die für die rekombinanten Immun-Interferonfragmente IFN- γ (-6), IFN- γ (-7), IFN- γ (-8), IFN- γ (-9), IFN- γ (-10) und IFN- γ (-11) kodieren, sind in den Beispielen ausführlich beschrieben. Ausgehend von diesen Beispielen ist es einem Durchschnittsfachmann durchaus möglich, Expressionsvektoren zu konstruieren, die fähig sind, die erfindungsgemäßen rekombinanten Immun-Interferonfragmente zu exprimieren. Die zur Expression rekombinanter Immun-Interferonfragmente befähigten replizierbaren Expressionsvektoren werden dann mittels der in den Beispielen oder der bei Maniatis et al. (supra) beschriebenen, spezifischen Verfahren in passende Wirtsorganismen transformiert. In Abhängigkeit von der verwendeten Wirtszelle können die rekombinanten Immun-Interferonfragmente glykosyliert sein oder nicht. Bevorzugte Wirtsorganismen sind E. coli (Stamm M15 oder W3110 [ATCC No. 27325], Bacillus subtilis und weitere mehr. Der meist bevorzugte Wirtsorganismus dieser Erfindung ist der oben erwähnte E. coli Stamm M15.

Sobald der zur Expression der Polypeptide der vorliegenden Erfindung befähigte Organismus hergestellt ist, kann das erfindungsgemäße Verfahren auf verschiedenste Art und Weise, in Abhängigkeit von der Konstruktionsweise der Expressionsvektoren und den Wachstumseigenschaften des Wirts, durchgeführt werden. Der Wirtsorganismus wird typischerweise unter Bedingungen gezüchtet, die zur Erzeugung einer großen Menge von Zellen vorteilhaft sind. Hat sich eine große Anzahl von Zellen angesammelt, können geeignete Induktoren oder Derepressoren im Wachstumsmedium oder ein Temperaturwechsel die mit einer solchen DNS-Sequenz ausgestat-

te Kontrollsequenz aktivieren, was zur Transkription und Translation der kodierenden Sequenz führt. In der vorliegenden Erfindung ist die Expression des für das rekombinante Immun-Interferonfragment kodierenden Gens durch den lac-Repressor inhibiert. Wenn sich eine große Anzahl von Zellen angesammelt hat, wird das Interferon durch Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) aktiviert. Das von der rekombinanten Zelle hergestellte Protein kann durch Aufschluß der Zelle durch konventionelle, dem Fachmann wohlbekannte Mittel, freigesetzt werden. Die bestimmten, zum Aufschluß der Zelle benutzten Mittel, sind abhängig vom verwendeten Wirtszelltyp. In der vorliegenden Erfindung werden die Zellen bevorzugt mit Guanidin-Hydrochlorid aufgeschlossen.

Die erfindungsgemäßen homogenen, rekombinanten Immun-Interferonfragmente können mit jeder bekannten Methode gereinigt werden, z. B. durch Fällung mit Ammoniumsulfat, durch Dialyse zum Entfernen von Salzen (bei normalen Bedingungen oder unter Vakuum), durch präparative, flachbetriebs-elektrische Fokussierung, durch Gelelektrophorese, durch chromatographische Methoden wie HPLC, Ionenaustauschchromatographie, Umkehrphasen-Chromatographie, Gelfiltration, Affinitätschromatographie und so weiter oder durch Verwendung monoklonaler oder polyklonaler Antikörper. Wie man auf Grund von SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese oder Analyse mittels HPLC schließen kann, sind die erhaltenen homogenen, rekombinanten Immun-Interferonfragmente im wesentlichen frei von anderen Proteinen.

Die rekombinanten Immun-Interferonfragmente können Dimere, Trimere oder Tetramere bilden, d. h., daß die gereinigten, rekombinanten Immun-Interferonfragmente als Kombinationen von zwei, drei oder vier solcher Fragmente vorliegen können. Die Art und Weise der Verknüpfung ist unklar.

Antivirale Aktivitäten der rekombinanten Immun-Interferonfragmente IFN- γ (-6), IFN- γ (-7), IFN- γ (-8), IFN- γ (-9), IFN- γ (-10), IFN- γ (-11) wurden mittels eines biologischen Nachweisverfahrens, basierend auf der Verminderung des cytopathischen Effektes, wie es Rubinstein et al. (J. Virol. 37, 755-758 [1981]) beschrieben ist, bestimmt. Menschliche Amnionzellen (FL-Zellen) und Sindbisvirus als Challenge-Virus wurden verwendet. Die Proben wurden bis auf etwa 1000 Einheiten/ml verdünnt und in Duplikaten auf Mikrotiterplatten titriert. Eine Präparation von reifem, rekombinantem Immun-Interferon voller Länge (Nr. 85.20 SX-Pool) wurde als Bezugsstandard verwendet. Sie wurde auf den NIH Human Interferon Gamma Referenzstandard, Nr. Gg 23-901-530 bezogen. Der NIH-Standard hatte einen Titer von $3.68 \pm 0.34 \log_{10}$ Einheiten/Ampulle ($n = 39$).

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 1 zusammengefaßt. Jeder Wert steht für das Mittel aus wenigstens 13 unabhängigen Bestimmungen. Geometrische Mittelwerte der Titer wurden in einem t-Test statistisch evaluiert. Unterschiede in der antiviralen Aktivität zwischen dem reifen, rekombinanten Immun-Interferon und den rekombinanten Immun-Interferonfragmenten sind äußerst signifikant ($P = 99\%$). Der Unterschied zwischen dem Titer von IFN- γ (-6) und dem von IFN- γ (-11) ist auch äußerst signifikant. Die Werte von IFN- γ (-6) und IFN- γ (-8) unterscheiden sich in signifikanter Weise ($P = 95\%$). Die antivirale Aktivität von IFN- γ (-8) und IFN- γ (-11) sind jedoch nicht signifikant verschieden.

Tabelle 1

Spezifische antivirale Aktivität

Reifes, rekombinantes Immun-Interferon (rIFN- γ)	$9.5 \cdot 10^6$ E/mg
Rekombinantes Immun-Interferonfragment IFN- γ (-6)	$4.1 \cdot 10^7$ E/mg
Rekombinantes Immun-Interferonfragment IFN- γ (-8)	$5.9 \cdot 10^7$ E/mg
Rekombinantes Immun-Interferonfragment IFN- γ (-11)	$7.0 \cdot 10^7$ E/mg

Um die erhöhte antivirale Aktivität besser studieren zu können, wurden weitere rekombinante Immun-Interferonfragmente hergestellt. Entweder wie oben beschrieben, z. B. IFN- γ (-4) und IFN- γ (-5), oder durch limitierte Proteolyse von reifem, rekombinantem Interferon voller Länge. So wurde zum Beispiel IFN- γ (-14) durch Verwendung der „Arg C“-Protease aus der Speicheldrüse der Maus, die Proteine spezifisch auf der Carboxy-Seite von Arginin spaltet (Schenkein et al., Arch. Biochem. Biophys. 182, 64-70 [1977]) hergestellt, während IFN- γ (-18) unter Verwendung des fibrinolytischen Enzyms Plasmin hergestellt wurde.

Die spezifische antivirale Aktivität dieser Polypeptide wurde, wie oben beschrieben, bestimmt. Tabelle 2 und Figur 12 zeigen, daß die rekombinanten Immun-Interferonfragmente IFN- γ (-8), IFN- γ (-9), IFN- γ (-10) und IFN- γ (-11) eine bedeutend höhere spezifische antivirale Aktivität zeigen als reifes, rekombinantes Immun-Interferon oder die durch limitierte Proteolyse erzeugten Immun-Interferonfragmente IFN- γ (-14) und IFN- γ (-18).

Tabelle 2

Spezifische Antivirale Aktivität (E/mg)
(in Klammern Grenzwerte mit 95 %-iger Zuverlässigkeit)

5	rIFN- γ	1.91×10^7 (1.36×10^7 - 2.67×10^7)
	IFN- γ (-4)	2.88×10^7 (2.19×10^7 - 3.80×10^7)
	IFN- γ (-5)	4.79×10^7 (3.54×10^7 - 6.47×10^7)
10	IFN- γ (-6)	3.39×10^7 (2.46×10^7 - 4.66×10^7)
	IFN- γ (-8)	7.08×10^7 (5.06×10^7 - 9.91×10^7)
	IFN- γ (-9)	9.33×10^7 (6.60×10^7 - 1.32×10^8)
	IFN- γ (-10)	8.32×10^7 (6.72×10^7 - 1.03×10^8)
15	IFN- γ (-11)	6.31×10^7 (4.99×10^7 - 7.97×10^7)

Die Immun-Interferonfragmente IFN- γ (-8), IFN- γ (-9), IFN- γ (-10) und IFN- γ (-11) zeigten eine deutlich höhere antiproliferative Wirkung und gesteigerte immunregulatorische Aktivitäten.

Die antiproliferative Aktivität kann durch Messung der inhibitorischen Wirkung der verschiedenen Immun-Interferone auf den Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin in zelluläre DNS bestimmt werden. Drei maligne Zelllinien (U 937, BS 14, LLC 1) und eine normale Fibroblastenzelllinie (AG 1523, Passage-Nr. 6-10) wurden verwendet. U 937 ist eine myelomonocytische Leukämiezelllinie, BS 14 stammt von einem Patienten mit einem malignen Melanom und LLC 1 von einem Patienten mit Lungenkrebs. Die Zellen wurden in Kulturschalen mit 96 Vertiefungen in RPMI 1640 mit 10 % fötalem Kälberserum, 1 % L-Glutamin (200 mM), 1 % Penicillin (100 E/ml)-Streptomycin (100 µg/ml), 1 % MEM nichtessentielle Aminosäuren (100x) und 1 % Natriumpyruvat (100 mM) bei unterschiedlichen Zelldichten gemäß ihren individuellen Wachstumskurven, ausplattiert: 20'000 Zellen/ml für U 937 und AG 1523 und 1'000 Zellen/ml für BS 14 und LLC 1. Den Zellen wurde 24 Stunden Zeit gegeben anzuhängen. Reifes, rekombinantes Immun-Interferon (rIFN- γ) und Immun-Interferonfragment IFN- γ (-10) wurden dann in die Vertiefungen gegeben. Platten für negative Kontrollen wurden nur mit Medium behandelt, während für die positiven Kontrollen Adriamycin in einer Konzentration von 10^{-8} bis 10^{-6} M verwendet wurde. Zwei Tage später wurde 3 H-Thymidin bis zu einer Endkonzentration von 1 µCi/Vertiefung zugegeben. Nach weiteren 18 Stunden Inkubation wurden die Zellen geerntet und der Einbau von Thymidin, wie bei Carr et al. (Cell Immunol. 5, 21-29 [1972]) beschrieben, bestimmt. Es wurde gefunden, daß eine 14-fach geringere Menge an Immun-Interferonfragment IFN- γ (-10) benötigt wird, um die gleiche antiproliferative Wirkung auf AG 1523 Zellen zu erreichen, wie mit reifem, rekombinantem Immun-Interferon (rIFN- γ). Gleichfalls wurde gefunden, daß eine 5-fach, 3-fach und 6-fach geringere Menge an IFN- γ (-10) nötig ist, um die gleiche antiproliferative Aktivität wie von rIFN- γ auf U 937, BS 14 und LLC 1-Zellen zu erhalten.

Immun-Interferon ist dafür bekannt, daß es verschiedene immunregulatorische Wirkungen vermittelt. Es scheint einer der makrophagenstimulierenden Faktoren (MAF) zu sein. Die Aktivierung von Makrophagen wurde auf zwei verschiedene Weisen gemessen. Normale menschliche Makrophagen, die gemäß Talmadge et al. (Eur. J. Immunol. 16, 1471-1477 [1986]) isoliert worden waren, wurden durch die verschiedenen, in der vorliegenden Anmeldung beschriebenen Formen von Immun-Interferon aktiviert. Oxidation wurde in Form von vermehrter Freisetzung von Peroxidase, wie bei Pick et al. (J. Immunol. Methods 46, 211-226 [1981]) beschrieben, gemessen, während die Induktion der bakteriziden Aktivität der Makrophagen, wie bei Peck et al. (J. Immunol. Methods 82, 131-140 [1985]) beschrieben, gemessen wurde. Weil Immun-Interferon seine immunregulatorische Wirkung durch seine Bindung an Membranrezeptoren ausübt, sind die immunregulatorischen Aktivitäten abhängig von der Bindung des Immun-Interferons an seinen Rezeptor. Die kompetitive Bindung von radioaktiv markiertem, reifem, rekombinantem Immun-Interferon und rekombinanten Immun-Interferonfragmenten (Kung, et al., Meth. in Enzymology 112, 296-301 [1986]) an den Interferonrezeptor wurde, so wie von Rashidbaigi et al. (J. Biol. Chem. 260, 8514-8519 [1985]) beschrieben, gemessen. Die Ergebnisse der oben erwähnten Experimente sind in Figur 13 zusammengefaßt. Zusätzlich zu der deutlich höheren, antiviralen Aktivität der Immun-Interferonfragmente IFN- γ (-8), IFN- γ (-9), IFN- γ (-10) und IFN- γ (-11) zeigten diese Immun-Interferonfragmente auch eine deutlich gesteigerte Aktivierung von Makrophagen und ein gesteigertes Rezeptorbindungsvermögen.

Wenn die neuen, rekombinanten Immun-Interferonfragmente mehrere Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt werden, erzeugt dies keine neuen Signale im HPLC-Diagramm, wie dies in dem Fall des reifen, rekombinanten Immun-Interferons voller Länge beobachtet wurde. Deshalb sind diese Fragmente zusätzlich zu ihrer höheren Aktivität auch stabiler.

Die erfindungsgemäßen, gereinigten, rekombinanten Immun-Interferonfragmente oder deren Mischungen

können zur Herstellung von pharmazeutischen Zusammensetzungen verwendet werden. Diese pharmazeutischen Zusammensetzungen enthalten neben einem physiologisch verträglichen Trägermaterial eine deutlich geringere Menge besagten oder besagter Interferonfragmente(s) wie an rekombinanten, menschlichem Immun-Interferon benötigt wird, um die im wesentlichen selbe antivirale Aktivität zu erhalten. Diese verminderte Menge beruht auf der deutlich höheren spezifischen, antiviralen Aktivität (in Einheiten/mg), die die rekombinanten Immun-Interferonfragmente zeigen (siehe Tabelle 1). Für die bevorzugten, erfindungsgemäßen, rekombinanten Immun-Interferonfragmente wurden diese verminderten Mengen unter Verwendung der Werte der spezifischen antiviralen Aktivitäten aus Tabelle 1 berechnet. Die verminderten Mengen betragen etwa:

- 23 % für das rekombinante Immun-Interferonfragment IFN- γ (-6),
- 16 % für das rekombinante Immun-Interferonfragment IFN- γ (-8) und
- 15 % für das rekombinante Immun-Interferonfragment IFN- γ (-11)

der Menge von reifem, rekombinantem Immun-Interferon (als 100 % gesetzt), die benötigt wird um dieselbe spezifische, antivirale Aktivität zu erhalten. Ähnliche Ergebnisse kann man unter Verwendung der Daten aus Tabelle 2 erhalten.

Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können in jeder üblichen Form wie a) in einer festen Form zur oralen Anwendung wie Tabletten, Kapseln, Pillen, Puder, Granula und ähnlichem; b) einer flüssigen Form zur oralen Anwendung, wie Lösungen, Syrup, Suspensionen, Elixire und ähnlichem; c) Präparaten zur parenteralen Anwendung, wie sterile Lösungen, Suspensionen oder Emulsionen; und d) Präparaten zur lokalen Anwendung wie Lösungen, Suspensionen, Salben, Cremes, Öle, mikronisierte Puder, Aerosole und ähnlichem, hergestellt werden. Die pharmazeutischen Präparate können sterilisiert sein und/oder Hilfsmittel wie Konservierungsmittel, Stabilisatoren, Feuchthalter, Emulgatoren, Salze für sich ändernde osmotische Drucke und/oder Puffer enthalten.

Parenterale Dosierungsformen können Infusionen oder injizierbaren Flüssigkeiten sein, die intravenös oder intramuskulös injizierbar sind. Diese Präparate können auch andere medizinisch wirksame Substanzen enthalten. Zusätzliche Additiva wie Konservierungsmittel, Stabilisatoren, Emulgatoren, Puffer und ähnliches können in Übereinstimmung mit der gängigen Praxis zur Herstellung pharmazeutischer Zusammensetzungen dazugegeben werden.

In Übereinstimmung mit dieser Erfindung können pharmazeutische Zusammensetzungen, die ein rekombinantes Immun-Interferonfragment enthalten, zur Behandlung viraler Infektionen, neoplastischer Krankheiten oder rheumatischer Arthritis eingesetzt werden.

Es kann in zur oralen, injizierbaren oder lokalen Anwendung geeigneter Zusammensetzung und Darreichungsform appliziert werden. Dosierungsmenge und -häufigkeit können analog derjenigen sein, die bei der klinischen Anwendung der bekannten Interferone verwendet werden; typischerweise 10^6 Einheiten pro Tag. Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen enthalten besagte, rekombinante Immun-Interferonfragmente zusammen mit einem dazu passenden, pharmazeutisch akzeptablen Trägermaterial. Jedes übliche Trägermaterial kann verwendet werden. Das Trägermaterial kann organischer oder anorganisch-inerter Natur sein, passend zu enteraler, percutaner oder parenteraler Anwendung. Passende Trägermaterialien sind Wasser, Gelatine, Gummi arabicum, Lactose, Stärke, Magnesiumstearat, Talk, Speiseöle, Polyalkylenglykole, Vaseline und ähnliches. Im weiteren können die pharmazeutischen Präparate andere pharmazeutisch aktive Mittel enthalten. Zusätzliche Additive wie Aromastoffe, Konservierungsmittel, Stabilisatoren, Emulgatoren, Puffer und ähnliches können in Übereinstimmung mit der gängigen Praxis pharmazeutischer Zusammensetzungen hinzugefügt werden.

Nachdem die Erfindung bis dahin allgemein beschrieben worden ist, wird dieselbe besser verständlich werden durch die einzelnen Beispiele, die hier zum Zwecke der Veranschaulichung und nicht zur Begrenzung aufgeführt sind.

Beispiel 1

A. Grundsätzliches

pDS8/RBS11, Sphi wurde zur Expression des reifen, rekombinanten, menschlichen Immun-Interferons und der erfindungsgemäßen rekombinanten Immun-Interferonfragmente ausgewählt. Für eine wirkungsvolle Expression enthält der oben genannte Vektor als Expressionskontrollsequenz das regulierbare Promotor/Operator-Element $P_{N25\%}$ (Stüber et al., EMBO J. 3, 3143-3148 [1984]) und die ribosomale Bindungsstelle RBS11, Sphi. Diese ribosomale Bindungsstelle wurde von der ribosomalen Bindungsstelle, die unter der Kontrolle des T5 E. coli-Phagenpromoters P_{G75} steht, abgeleitet und mittels DNA-Synthese hergestellt (R. Gentz, Doktorarbeit, Universität Heidelberg, BRD [1984]). Auf Grund der hohen Wirksamkeit dieser Expressionssignale ist der oben erwähnte Vektor in E. coli nur dann stabil, wenn das Promotor/Operator-Element durch Bindung des lac-Repressors an die

Operatoreinheit von $P_{N254/0}$ unterdrückt wird. Der lac-Repressor wird von dem lacI-Gen kodiert. $P_{N254/0}$ wird nur dann wirksam unterdrückt, wenn eine ausreichende Menge an Repressormolekülen vorhanden ist. Deshalb wurde das lacI^q-Allel verwendet, das einen mutierten Promotor enthält, was zu einer gesteigerten Expression des Repressorgens führt. Das lacI^q-Allel ist im Plasmid pDMI,1 (Fig. 4) enthalten. Dieses Plasmid trägt zusätzlich zum lac-Gen das neo-Gen, wodurch Resistenz gegen Kanamycin als selektivem Marker vermittelt wird. Das Plasmid pDMI,1 ist vereinbar mit dem Expressionsvektor pDS8/RBSII, SphI. Die E. coli Zellen, die mit auf pDS8/RBSII, SphI basierenden Expressionsvektoren zu transformieren sind, müssen pDMI,1 enthalten, damit das Vorhandensein des Expressionsvektors gewährleistet ist. Die Induktion der Expression in diesem System läßt sich leicht durch Zugabe von IPTG bei der gewünschten Zelldichte zum Medium erreichen.

B. Plasmid pDS8/RBSII, SphI

Der zwischen den Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen XbaI und XhoI liegende Teil von pDS8/RBSII, SphI (Figur 2), der die zur Replikation der DNS und der Stabilisierung des Plasmids in der Zelle benötigte Region, einschließlich des ganzen Gens der β -Laktamase, das die Ampicillinresistenz liefert, enthält, stammt von dem Plasmid pBR322 (Bolívar et al., Gene 2, 95-113 [1977]; Sutcliffe, supra). Der übrige Teil des Plasmids trägt das regulierbare Promotor/Operator-Element $P_{N254/0}$ (Stüber et al., supra) gefolgt von der ribosomalen Bindungsstelle RBSII, SphI, die Teil eines EcoRI/BamHI Fragmentes ist, von der für die Dihydrofolatreduktase der Maus-AT-3000-Zelllinie kodierenden Region (Chang et al., Nature 275, 617-624 [1978]; Masters et al., Gene 21, 59-63 [1983]), von dem Terminator $t_{\text{E. coli}}$ Phagen Lambda (Schwarz et al., Nature 272, 410-414 [1978]), von dem promotorfreien Gen für Chloramphenicol-Acetyltransferase (Marcoli et al., FEBS Letters 110, 11-14 [1980]) und von dem Terminator T1 des E. coli rmb-Operons (Brosius et al., J. Mol. Biol. 148, 107-127 [1981]).

C. Plasmid pDMI,1

Das Plasmid pDMI,1 (Figur 4) trägt das Neomycin-Phosphotransferasegen des Transposons Tn5 (Beck et al., Gene 12, 327-336 [1982]), das die Kanamycinresistenz beisteuert und das lacI-Gen (Farabaugh, Nature 274, 765-769 [1978]) mit der Promotormutation I^q (Calos, Nature 274, 762-765 [1978]), das für den lac-Repressor kodiert. Im weiteren enthält pDMI,1 eine Region des Plasmids pACYC184 (Chang et al., J. Bacteriol. 134, 1141-1156 [1978]) mit der zur Replikation und zur Stabilisierung in E. Coli benötigten Information.

Beispiel 2

Aufbau des Plasmids pGLS, das für IFN- γ kodiert.

A. Grundsätzliches

Unter Verwendung chemisch synthetisierter Oligonukleotide wurde das IFN- γ -Gen an die ribosomale Bindungsstelle RBSII, SphI (Figur 6) angepaßt. Das für IFN- γ -kodierende Fragment wurde isoliert und in pDS8/RBSII, SphI eingebaut, wodurch das Plasmid pGLS (Figur 7) entstand.

B. Synthese der synthetischen Oligonukleotidfragmente, die das IFN- γ -Gen an RBSII, SphI anpassen.

Die synthetischen Oligonukleotidfragmente sind in Figur 6 abgebildet. Die Oligonukleotidfragmente selbst wurden gleichzeitig auf einer Multisynthesemaschine, wie sie in der EP-A-1-181491 beschrieben ist, unter Verwendung von porösem Glas mit einheitlicher Porengröße („controlled poreglass“ CPG) als Phasenmaterial synthetisiert (Kiefer et al., Immunol. Meth. 3, 69-83 [1985]; Sproat et al., Tetrahedr. Lett. 24, 5771-5774 [1983]; Adams et al., J. Am. Chem. Soc. 105, 661-663 [1983]). Die hydrophilierten Oligonukleotide wurden während 1 Stunde bei 40 °C in Wasser gelöst und auf eine DNA-Konzentration von 100 nmol/ml eingestellt.

150 pmol jedes Oligonukleotids wurden in Gegenwart von 1 μ l [³²P]-ATP (2 pmol, 5000 Ci/mmol) in 10 μ l 50 mM Tris/HCl (pH 8,5), 10 mM MgCl₂ 10 Minuten bei 37 °C mit 1 Einheit (E) T4-Polynukleotidkinase (Gibco-BRL, Basel) behandelt. Alle Reaktionen wurden durch Zugabe von 1 μ l 5 mM ATP und anschließendes 7minütiges Erhitzen der Proben auf 65 °C beendet.

C. Aufbau und Reinigung des IFN- γ -kodierenden Fragmentes 1

4 μ g Plasmid pRC23/IFI-900 (EP-A299084) mit einer DNA-Konzentration von 400 μ g/ml wurden mit 10 ENdel in von Gibco-BRL in Basel gelieferten BRL-Basispuffer (50 mM Tris/HCl (pH 8), 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl) während 1 Stunde bei 37 °C in einem Gesamtvolumen von 20 μ l geschnitten. Nach der Spaltung wurde die DNA einmal phenolextrahiert, einmal mit Ether behandelt, mit Ethanol gefällt und der Niederschlag während 2 Minuten in einer Vakuumzentrifuge (Speed-vac) getrocknet. Der Niederschlag wurde in T4-Ligasepuffer (50 mM Tris/HCl (pH 7,8), 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 500 μ M ATP) aufgelöst. 25 pmol der phosphorylierten, den SphI-Ndel-Adapter (1) (Figur 6) enthaltende Oligonukleotide wurden in 1 x Ligasepuffer zugegeben und das Endvolumen auf

25 µl eingestellt. Verknüpfungsreaktionen wurden während 3 Stunden bei 22 °C unter Verwendung von 1 µl DNS-Ligase (1 Weiß-Einheit, Boehringer, Mannheim) durchgeführt. Die Verknüpfungsreaktion wurde durch 7minütiges Erhitzen der Probe auf 65 °C beendet. Die DNA wurde mit Ethanol gefällt, wie oben beschrieben getrocknet, in 50 µl NcoI-Reaktionspuffer (50 mM Tris/HCl (pH 8), 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 50 mM KCl) suspendiert, 10 E NcoI (BRL-Gibco, Basel) zugegeben und das Gemisch während 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Das Restriktionsenzym wurde durch 7minütiges Erhitzen der Probe auf 65 °C inaktiviert. Nach einer Phenolextraktion wurde die DNA gefällt und wie oben beschrieben getrocknet. Der Niederschlag wurde in 20 µl Klenow-Puffer (50 mM Tris/HCl (pH 7,2), 10 mM MgSO₄, 100 µM DTT) aufgelöst, und dATP, dGTP, dCTP und dTTP wurden bis zu einer Endkonzentration von 100 µM zugegeben (gesamtes Reduktionsvolumen 30 µl). Klenow-Enzym (1 Einheit, Boehringer Mannheim) wurde zugegeben und die Probe während 1 Stunde bei 22 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl 0,25 M EDTA beendet. Die Mischung wurde einmal mit Phenol extrahiert, und die DNA wurde wie oben beschrieben gefällt und in SphI-Reaktionspuffer (50 mM Tris/HCl (pH 7,5), 6 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 6 mM 2-Mercaptoethanol) wieder aufgenommen. Nach Zugabe von 10 E SphI (BRL-Gibco, Basel) wurde die Probe während 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Spaltung wurde durch 7minütiges Erhitzen bei 65 °C beendet und nachfolgend eine Phenolextraktion durchgeführt. Die DNA wurde gefällt und wie oben beschrieben getrocknet.

Der DNA-Niederschlag wurde in 10 µl Gelelektrophoreseprobenpuffer aufgelöst, und die DNA-Fragmente wurden auf einem 6%-igen Polyacrylamidgel in 0,5 x Tris-Acetat-Puffer (40 mM Tris/HCl (pH 7,8), 20 mM Natriumacetat, 2 mM EDTA) elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Färbung mit Ethidiumbromid (0,5 µl/ml) wurden die Banden unter einem UV-Licht von 300 nm sichtbar gemacht. Die Bande mit der für das IFN-γ-Gen kodierenden DNA wurde mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten. Als Maker-DNA wurde HaeIII (Gibco-BRL, Basel) geschnittene ØX Phagen-DNA verwendet. Das Gelstück wurde in eine Vertiefung von 4 auf 4 mm eines 0,7%-igen Agarosegels enthaltend TBE-Puffer (90 mM Tris-Borat, 90 mM Borsäure, 3 mM EDTA, pH 8,3) übertragen. Die Vertiefung wurde mit flüssiger 0,7%-iger Agarose in 1 x TBE versiegelt, um ein gleichmäßiges, elektrisches Feld zu gewährleisten. Vor der Probe wurde ein Stück einer NA45-Membran (Schleicher und Schüll, Dassel, BRD) eingefügt, und die DNA wurde während 5 Minuten bei 300 V mittels Elektrophorese auf die Membran übertragen. Der Membranstreifen mit der DNA wurde dann mit destilliertem Wasser gewaschen und in ein Eppendorfgefäß mit 250 µl 1,5 M Lithiumacetat, 50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA übertragen. Die DNS wurde während 20 Minuten bei 65 °C unter gelegentlichem Schütteln eluiert. Der Membranstreifen wurde aus dem Gefäß entfernt, und die Probe wurde einmal mit 200 µl Phenol, das mit 1 M Tris/HCl (pH 8,0) gesättigt ist, extrahiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation der Proben bei 12000 rpm in einer Mikrozentrifuge wurde der Überstand mit der DNA entnommen. Die DNA wurde auf Trockeneis während 10 Minuten durch Zugabe von 20 µl 5 M Lithiumacetat und 440 µl Isopropanol gefällt. Die DNS wurde während 10 Minuten bei 12000 rpm in einer Mikrozentrifuge sedimentiert. Der Niederschlag wurde mit 80%-igem Ethanol gewaschen, im Vakuum getrocknet und in 10 µl Puffer (10 mM Tris/HCl (pH 7,6), 1 mM EDTA) aufgelöst.

D. Herstellung des Plasmids pDS8/RBSIII, SphI

2 pmol des Plasmids pDS8/RBSII, SphI (400 µg/ml) wurden mit 10 E SphI in Basispuffer bei 37 °C in einem Volumen von 50 µl während einer Stunde gespalten. 1 E Scal wurde zugegeben und die Spaltung für weitere 30 Minuten fortgesetzt. Nach der Spaltung wurde die Probe einmal phenolextrahiert, mit Ether behandelt, gefällt und wie oben beschrieben getrocknet. Der Niederschlag wurde in 20 µl Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 8) enthaltend 1 Einheit Kalbsdarnphosphatase (CIP, Boehringer, Mannheim) aufgelöst und während einer Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach der Hitzeinaktivierung des Enzyms und dem Entfernen der Proteine (siehe oben) wurde die DNA mit Ethanol gefällt. Nach Resuspendierung der DNA wurde das Scal/SphI-Fragment von pDS8/RBSII, das Teile des cat-Gens, den Terminator T1, den Replikationsursprung, das bla-Gen, den Promotor P_{N25*}₁₀ und die ribosomale Bindungsstelle RBSIII, SphI enthält, durch Elektrophorese in einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt und elektrophoretisch auf NA45-Membranen übertragen. Nachfolgende Elution, Ethanolfüllung und Resuspendierung in 100 µl TE-Puffer wurde wie oben beschrieben ausgeführt. Etwa 1 pmol des Vektorfragmentes wurde erhalten.

E. Zusammenbau des pGLS-Plasmids

2 µl Vektorfragment wurden mit 2 µl Fragment 1-DNA in Ligase-Puffer (siehe oben), enthaltend 1 µl DNS-Ligase (1 Weiß-Einheit, Boehringer Mannheim), in einem Gesamtvolumen von 20 µl verknüpft. Verknüpfungen wurden während 3 Stunden bei 22 °C durchgeführt. Eine Kontroll-Verknüpfung ohne Fragment 1-DNA wurde parallel dazu durchgeführt. Die Verknüpfungsreaktionen wurden durch 7minütiges Erhitzen der Proben auf 65 °C beendet. Die zur Transformation verwendeten, aufnahmebereiten E. coli M15-Zellen wurden nach der Methode von Morrison (Methods Enzymol. 68, 326-331 (1979)) hergestellt. Die Verknüpfungsmischungen wurden zu 200 µl aufgetauten, aufnahmebereiten E. coli M15-Zellen gegeben, die das pDM1,1-Plasmid enthalten. Die Proben wurden 30 Minuten

lang auf Eis gelegt und nachfolgend während 2 Minuten bei 42 °C inkubiert. Nach Zugabe von 0.5 ml LB-Medium wurden die Proben während 90 Minuten bei 37 °C im Wasserbad gehalten. Die Zellen wurden dann während 30 Sekunden bei 12.000 rpm in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen, und die Niederschläge wurden in 100 µl LB-Medium suspendiert und auf 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin enthaltenden LB-Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach Transformation der Kontroll-Verknüpfung wurden keine Transformanten erhalten. Verknüpfung mit Fragment 1 ergab etwa 200 Transformanten. Einzelne Kolonien wurden mit einem Zahnstocher herausgespickt, in ein Röhrchen mit 10 ml LB-Medium, enthaltend 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin, übertragen und während 12 Stunden bei 37 °C unter starkem Schütteln wachsen gelassen. Die Zellen wurden 10 Minuten bei 8000 rpm zentrifugiert. Plasmid-DNS wurde nach der Methode von Birnboim et al. (Nucleic Acid Res. 7, 1513-1523, [1979]) extrahiert.

Die schließlich erhaltenen Niederschläge wurden in 200 µl TE-Puffer aufgelöst. 4 µl wurden mit SphI und XbaI gespalten, um das Fragment mit dem IFN-γ-Gen und dem Terminator T1 freizusetzen. Alle analysierten DNA-Proben besaßen das Fragment der erwarteten Größe von 1 kb. Diese Plasmide wurden pGLS genannt.

15 F. Sequenzanalyse des in pGLS klonierten IFN-γ-Gens

Um zu bestätigen, daß die richtige IFN-γ-Sequenz in pGLS eingebaut ist, wurde die doppelsträngige, zirkuläre Plasmid-DNS mittels eines mit [γ-³²P]-ATP endmarkierten Starters sequenziert. Der Starter enthält die Nukleotide von Position 199-218 von pDS8/RBSII, SphI und endet deshalb 6 Nukleotide vor dem ATG der SphI-Schnittstelle. 15 µl der isolierten DNS (0.3 pmol) wurden mit Ethanol gefüllt und einmal mit 80%-igem Ethanol gewaschen. Nachdem der Niederschlag 2 Minuten in einer Vakuumzentrifuge getrocknet worden war, wurde der Niederschlag in 8 µl 1/4 TE-Puffer aufgelöst. Nach Zugabe von 2 pmol des mit [γ-³²P]-ATP endmarkierten Starters wurden die Proben 5 Minuten auf 95 °C erhitzt und dann 5 Minuten in ein Wasserbad von 42 °C gestellt. Zur Sequenzierung der Fragmente wurde im wesentlichen die von Sanger et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74, 5463-5467 [1977]) beschriebene Dideoxykettenabbruchsmethode verwendet, außer daß, da der Primer radioaktiv markiert war, nicht markierte Deoxyribonukleotridiphosphate (dXTPs) zur Verlängerungsreaktion verwendet wurden.

Die Sequenzdaten bewiesen, daß das Immun-Interferongen richtig in das Plasmid pGLS eingebaut worden war.

30 Beispiel 3

Aufbau der Plasmide pIFN-γ(-6), pIFN-γ(-7), pIFN-γ(-8), pIFN-γ(-9), pIFN-γ(-10) und pIFN-γ(-11).

35 A. Grundsätzliches

Chemisch synthetisierte Oligonukleotide mit Translationsstopcodons an den gewünschten Positionen wurden mit der einzigen HinfI-Erkennungsstelle des IFN-γ-Gens (Figur 8) verbunden, was schließlich die Fragmente F(-6), F(-7), F(-8), F(-9), F(-10) und F(-11) ergab. Diese Fragmente wurden in pDS8/RBSII, SphI eingebaut, wobei sich die Plasmide pIFN-γ(-6), pIFN-γ(-7), pIFN-γ(-8), pIFN-γ(-9), pIFN-γ(-10) und pIFN-γ(-11) (Figur 9) ergaben.

35 B. Herstellung der Fragmente F(-6), F(-7), F(-8), F(-9), F(-10) und F(-11).

3 pmol pGLS-Plasmid wurden mit 15 E HinfI (Figur 8) in Basispuffer bei 37 °C in einem Volumen von 50 µl während 1 Stunde gespalten. Nach Spaltung wurde das Restriktionsenzym durch 7minütige Inkubation bei 65 °C inaktiviert, die Probe phenolextrahiert, mit Ether behandelt, gefällt und wie oben beschrieben getrocknet. Der Niederschlag wurde in 50 µl Ligase-Puffer aufgelöst. Die Oligonukleotide einschließlich der Adapter A(-6), A(-7), A(-8), A(-9), A(-10) und A(-11) wurden, wie in Beispiel 2B beschrieben, synthetisiert. 100 pmol der phosphorylierten Adapter wurden, jeweils zu 10 µl HinfI gespaltenem pGLS-Plasmid gegeben. Nach Zugabe des Ligase-Puffers und 1 Einheit T4-DNA-Ligase wurden die Verknüpfungen in einem Gesamtvolumen von 25 µl während 12 Stunden bei 22 °C durchgeführt. Die Reaktionen wurden durch 7minütiges Erhitzen der Proben auf 65 °C beendet. Nach der Fällung mit Ethanol wurden die DNA-Niederschläge in Basispuffer resuspendiert und mit 15 E EcoRI und 20 E HindIII während 2 Stunden bei 37 °C in einem Volumen von 50 µl gespalten. Nach Hitzeinaktivierung, Phenolextraktion, Behandlung mit Ether und Ethanolgefällung, wurden die Proben in 10 µl Gelladepuffer aufgelöst und mittels Elektrophorese auf einem 6%-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die DNA-Banden wurden unter einem UV-Licht von 300 nm sichtbar gemacht. Die, die IFN-γ-Gene enthaltenden, Banden wurden aus dem Gel geschnitten und, wie oben beschrieben, auf eine NA45-Membran mittels Elektrophorese übertragen. Die verwendete Marker-DNS war HaeIII gespaltene ΦX-Phagen-DNS. Die DNA-Stücke wurden wie beschrieben eluiert und F(-6), F(-7), F(-8), F(-9), F(-10) bzw. F(-11) genannt.

55 C. Herstellung von Plasmid pDS8/RBSII, SphI

Wie in Figur 9 ausgeführt, wurden 2 pmol pDS8/RBSII, SphI-Plasmid mit 10 E EcoRI und 10 E HindIII während 1 Stunde in einem Gesamtvolumen von 50 µl bei 37 °C gespalten. Nach Hitzeinaktivierung des Enzyms und

Ethanolfällung wurde der DNA-Niederschlag in 10 µl Gelladepuffer aufgelöst. Nach Elektrophorese in einem 1%-igen Agarosegel wurde das den t_0 -Terminator, das cat-Gen, den T1-Terminator, den Replikationsursprung, das bla-Gen und den $P_{N25\%}$ -Promotor enthaltende Fragment aus dem Gel geschnitten und wie beschrieben eluiert. Der schließlich erhaltene DNA-Niederschlag wurde in 50 µl Ligase-Puffer aufgelöst.

D. Aufbau der Plasmide pIFN- γ (-6), pIFN- γ (-7), pIFN- γ (-8), pIFN- γ (-9), pIFN- γ (-10) und pIFN- γ (-11).

10 µl des Vektorfragments und die Hälfte der Menge jedes gereinigten, in Beispiel 3B erhaltenen Fragments F(-6), F(-7), F(-8), F(-9), F(-10) und F(-11) wurden nebeneinander mittels 1 Einheit T4-Ligase in einem Volumen von 20 µl während 3 Stunden bei 22 °C verknüpft. Eine Kontrollverknüpfung ohne Fragment-DNS wurde parallel dazu durchgeführt. Die Verknüpfungsreaktionen wurden durch 7minütiges Erhitzen der Proben auf 65 °C beendet.

Transformationen wurden so wie bei Morrison (supra) beschrieben unter Verwendung von E. coli M15-Zellen, die das Plasmid pDML1 enthalten, durchgeführt. Die Zellen wurden, wie oben beschrieben, auf LB-Agarplatten mit 100 µl/ml Ampicillin und 25 µl/ml Kanamycin ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Wie erwartet wurden in den Kontrollverknüpfungen keine Transformanten erhalten. Da, wo die Vektor-DNA mit den Fragmenten verknüpft war, wurden 500-1000 Kolonien erhalten. Einzelne Kolonien wurden mit einem Zahnstocher herausgepickt und wie beschrieben in 10 ml LB-Medium wachsen gelassen. Plasmid-DNA wurde gemäß der Methode von Birnboim et al., (supra) extrahiert. Die schließlich erhaltenen Niederschläge wurden in 200 µl TE-Puffer aufgelöst. 4 µl der gereinigten DNA wurde mit 2 E EcoRI und 2 E HindIII gespalten. Alle getesteten Klone zeigten ein Fragment der erwarteten Größe von 450 bp frei.

Die das Fragment F(-6) enthaltenden Plasmide wurden pIFN- γ (-6) genannt, während die Plasmide die F(-7), F(-8), F(-9), F(-10) und F(-11) enthalten als pIFN- γ (-7), pIFN- γ (-8), pIFN- γ (-9), pIFN- γ (-10) und pIFN- γ (-11) bezeichnet wurden. Diese Plasmide sind Expressionsvektoren für die Gene die die rekombinanten Immun-Interferonfragmente IFN- γ (-6), IFN- γ (-7), IFN- γ (-8), IFN- γ (-9), IFN- γ (-10) und IFN- γ (-11) kodieren (Figure 10).

Beispiel 4

Expression von IFN- γ -Genen in E. coli

A. Grundsätzliches

Um zu zeigen, daß die modifizierten IFN- γ -Gene in E. coli in einer großen Zahl exprimiert werden, wurden sie in E. coli M15 (pDML1), die mit pIFN- γ (-6), pIFN- γ (-7), pIFN- γ (-8), pIFN- γ (-9), pIFN- γ (-10) oder pIFN- γ (-11) transformiert sind, exprimiert und die gesamten, zellulären Proteine durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert.

B. Herstellung von IFN- γ -Proteinen in E. coli

Die das Plasmid pDML1 enthaltenden E. coli M15-Zellen wurden mit pIFN- γ (-6), pIFN- γ (-7), pIFN- γ (-8), pIFN- γ (-9), pIFN- γ (-10) oder pIFN- γ (-11) und parallel dazu mit pGLS als Kontrolle transformiert. Die Transformanten wurden in 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin haltigem LB-Medium aufgezogen. Bei einer optischen Dichte von etwa 0.7 bei 600 nm wurden die Kulturen mit IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert. Nach zusätzlichen 6 Stunden Inkubation wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet.

C. Sichtbarmachung der in E. coli hergestellten Proteine

Zellen von 40 µl Kultur wurden in 3 % SDS, 3 % β -Mercaptoethanol, 20 % Glycerin und 125 mM Tris/HCl (pH 6.8) enthaltendem Probenpuffer resuspendiert. Die Proben wurden 5 Minuten gekocht, auf Eis abgekühlt, 30 Sekunden bei 12000 x g zentrifugiert und gemäß dem von Laemmli (Nature 227, 680-685, [1979]) beschriebenen Verfahren mittels eines SDS-Polyacrylamidgels (12.5 % Acrylamid, Verhältnis Acrylamid zu Bisacrylamid 30/0.8) aufgetrennt. Nach Färben der Proteine mit Coomassie Brilliant-Blau R-250 wurde der nichtgebundene Farbstoff vom Gel entfernt. Das Gel zeigte, daß die rekombinanten Immun-Interferonfragmente IFN- γ (-6), IFN- γ (-7), IFN- γ (-8), IFN- γ (-9), IFN- γ (-10) und IFN- γ (-11) in E. coli in größerer Menge als das rekombinante, reife Immun-Interferon hergestellt werden, obwohl alle Proteine unter der Kontrolle der gleichen Expressionskontrollsequenz stehen.

Beispiel 5

Reinigung der rekombinanten Immun-Interferonfragmente

Alle rekombinanten Immun-Interferonfragmente wurden bis zur Homogenität nach der folgenden Methode gereinigt. Rekombinante E. coli-Zellen, die einen Expressionsvektor für ein rekombinantes Immun-Interferonfragment enthalten, wurden, wie oben beschrieben, gezüchtet. Nach Induktion mit IPTG und zusätzlicher 6stündiger

Inkubation wurden die Zellen zentrifugiert (4000 x g, 10 Minuten, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen. Die Zellen (100 g) wurden mit 7 M Guanidin-Hydrochlorid in 0.01 M Natriumboratlösung bei pH 8.0 (300 ml) aufgeschossen. Die so erhaltene Suspension wurde 1 Stunde bei 4 °C gerührt. Das gelöste, rekombinante Immun-Interferonfragment wurde von unlöslichen Partikeln durch Zentrifugation (10000 x g, 30 Minuten, 4 °C) abgetrennt. Der Überstand wurde mit dem 10-fachen Volumen 0.15 M Natriumborat (pH 8.0) verdünnt und die restlichen Partikel durch Zentrifugation wie zuvor sedimentiert. 360 g Silicagel 100 (Teilchengröße 0.063-0.200 mm) wurden zum Rohextrakt gegeben. Die Suspension wurde sorgfältig gerührt, um eine Sedimentation zu vermeiden. Nach einer Stunde wurde das Rühren beendet. Nach Absetzen des Sediments wurde der Überstand verworfen und das Sediment in eine Säule übertragen. (Durchmesser 5 cm, Länge 17.5 cm). Das Silicagel in der Säule wurde mit 1 M NaCl in 0.01 M Natriumborat (pH 8.0) gewaschen (Durchflußrate 6 ml/min). Das rekombinante Immun-Interferonfragment wurde mit 0.5 M Tetramethylammoniumchlorid und 0.7 M Ammoniumsulfat in 0.01 M Natriumboratlösung (pH 8.0) (Durchflußrate: 6 ml/min) eluiert. Das Eluat wurde sofort auf eine Phenyl-Sepharosesäule mit speziell hoher Durchflußrate (Durchmesser 5 cm, Länge 21 cm, Pharmacia, Prototypgel KK33904), die mit 0.5 M Tetramethylammoniumchlorid und 0.7 M Ammoniumsulfat in 0.01 M Natriumboratlösung (pH 8.0) (Durchflußrate 6 ml/min) äquilibriert worden war, aufgetragen. Das rekombinante Immun-Interferonfragment befand sich im Eluat, während Proteasen von der Matrix gebunden werden. Die Säule wurde durch Waschen der Matrix mit 0.01 M Natriumboratlösung (pH 8.0) wieder erneuert. In einem nächsten Schritt wurde das von der Phenyl-Sepharosesäule eluierte, rekombinante Immun-Interferonfragment an eine mit 0.7 M Ammoniumsulfat in 0.01 M Natriumboratlösung (pH 8.0) äquilibrierte Phenyl-Sepharose CL-4B-Säule (Durchmesser 5 cm, Länge 21 cm, Pharmacia) adsorbiert. Die Säule wurde ausführlich gewaschen und das rekombinante Immun-Interferonfragment mit einem 4-stündigen, linearen Gradienten gegen 0.01 M Natriumboratlösung (pH 8.0) eluiert. Das Eluat wurde mit dem vierfachen Volumen Wasser verdünnt und auf eine, mit pyrogenfreiem 0.05 M Natriumphosphatlösung (pH 6.0) äquilibrierte Fractogel TSK CM-650 (M)-Säule (Durchmesser 2.6 cm, Länge 18 cm, Merck) aufgetragen (Durchflußrate 4 ml/min). Das rekombinante Immun-Interferonfragment wurde mittels eines linearen NaCl-Gradienten von 0-0.6 M NaCl eluiert. Im letzten Reinigungsschritt wurde die das rekombinante Immun-Interferonfragment enthaltende Fraktion auf eine mit 0.05 M Natriumphosphatlösung (pH 7.5) (pyrogenfrei) äquilibrierte Sephadex G-50 Superfein-Säule (Durchmesser 5 cm, Länge 85 cm, Pharmacia) aufgetragen. Die Durchflußrate wurde auf 2 ml pro Minute eingestellt.

Die so gereinigten Immun-Interferonfragmente waren gemäß analytischer RP-18 HPLC und SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese homogen. Zur C-terminalen Aminosäureanalyse wurden die gereinigten Proteine mit Staphylococcus aureus V8-Protease gespalten. Die C-terminalen Peptide wurden mittels RP-18 HPLC isoliert, lyophilisiert, in HCl hydrolysiert und einer Aminosäureanalyse unterzogen. Die erwarteten Aminosäuren wurden im Hydrolysat gefunden.

Es stellte sich heraus, daß die rekombinanten Immun-Interferonfragmente nach steriler Filtration mehrere Monate bei 4 °C Lagerung stabil sind.

PATENTANSPRÜCHE

5

10

1. Homogenes, rekombinantes Immun-Interferonfragment, dem im Vergleich zum reifen, rekombinanten, menschlichen Immun-Interferon voller Länge Aminosäuren am C-Terminus fehlen, dadurch gekennzeichnet, daß ihm 6 bis 11 Aminosäuren fehlen.

2. Homogenes, rekombinantes Immun-Interferonfragment nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Aminosäuresequenz

15

X-Y-Asp-Pro-Tyr-Val-Lys-Glu-Ala-Glu-Asn-Leu-Lys-Lys-Tyr-Phe-
Asn-Ala-Gly-His-Ser-Asp-Val-Ala-Asp-Asn-Gly-Thr-Leu-Phe-Leu-
Gly-Ile-Leu-Lys-Asn-Trp-Lys-Glu-Glu-Ser-Asp-Arg-Lys-Ile-Met-
Gln-Ser-Gln-Ile-Val-Ser-Phe-Tyr-Phe-Lys-Leu-Phe-Lys-Asn-Phe-
Lys-Asp-Asp-Gln-Ser-Ile-Gln-Lys-Ser-Val-Glu-Thr-Ile-Lys-Glu-
Asp-Met-Asn-Val-Lys-Phe-Phe-Asn-Ser-Asn-Lys-Lys-Lys-Arg-Asp-
Asp-Phe-Glu-Lys-Leu-Thr-Asn-Tyr-Ser-Val-Thr-Asp-Leu-Asn-Val-
Gln-Arg-Lys-Ala-Ile-His-Glu-Leu-Ile-Gln-Val-Met-Ala-Glu-Leu-
Ser-Pro-Ala-Ala-Lys-Thr-Gly-Lys-Arg-Lys-Arg-Z

25

aufweist, worin entweder X für Methionin und Y für Glutamin oder X für Wasserstoff und Y für Glutamin oder Pyroglutaminsäure und Z für

30

Ser,
Ser-Gln,
Ser-Gln-Met,
Ser-Gln-Met-Leu,
Ser-Gln-Met-Leu-Phe oder
Ser-Gln-Met-Leu-Phe-Arg steht.

35

3. Homogenes, rekombinantes Immun-Interferonfragment nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß es in Form eines Dimeren, Trimeren oder Tetrameren vorliegt.

40

4. Replizierbarer, mikrobieller Expressionsvektor, dadurch gekennzeichnet, daß er eine Nukleotidsequenz enthält, die für ein rekombinantes Immun-Interferonfragment nach einem der Ansprüche 1 bis 3 codiert und daß die Nukleotidsequenz operativ mit einer Expressions-Kontrollsequenz verbunden ist.

45

5. Replizierbarer, mikrobieller Expressionsvektor nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß er ein Plasmid aus der Gruppe pIFN- γ (-6), pIFN- γ (-8) und pIFN- γ (11) ist.

50

6. Replizierbarer, mikrobieller Expressionsvektor nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß er ein Plasmid aus der Gruppe pIFN- γ (-7), pIFN- γ (-9) und pIFN- γ (-10) ist.

7. Mikroorganismus, dadurch gekennzeichnet, daß er mit einem replizierbaren, mikrobiellen Expressionsvektor gemäß einem der Ansprüche 4 bis 6 transformiert ist und daß er zur Expression eines rekombinanten Immun-Interferonfragmentes gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 befähigt ist.

55

8. Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten Immun-Interferonfragmentes gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Kultur eines Mikroorganismus, der mit einem replizierbaren, zur Expression des besagten Interferonfragmentes befähigten Expressionsvektors transformiert ist, hochwachsen läßt, das besagte Interferonfragment exprimiert und isoliert.

9. Verfahren zur Herstellung eines Mikroorganismus gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß ein Mikroorganismus mit einem replizierbaren, mikrobiellen Expressionsvektor gemäß einem der Ansprüche 4 bis 6 transformiert wird.
- 5 10. Pharmazeutische Zusammensetzungen, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine oder mehrere rekombinante Interferonfragmente gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 und ein physiologisch verträgliches Trägermaterial enthalten.
- 10 11. Pharmazeutische Zusammensetzungen gemäß Anspruch 10 zur parenteralen Applikation.
12. Pharmazeutische Zusammensetzungen gemäß Anspruch 10 zur topischen Applikation.
13. Pharmazeutische Zusammensetzungen gemäß Anspruch 10 zur intranasalen Applikation.
- 15 14. Verwendung eines rekombinanten Immun-Interferonfragmentes gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, oder einer pharmazeutischen Zusammensetzung gemäß Anspruch 10 zur Behandlung viraler Infektionen.
16. Verwendung eines rekombinanten Immun-Interferonfragmentes gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 oder einer pharmazeutischen Zusammensetzung gemäß Anspruch 10 zur Behandlung neoplastischer Erkrankungen.
- 20 16. Verwendung eines rekombinanten Immun-Interferonfragmentes gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 oder einer pharmazeutischen Zusammensetzung gemäß Anspruch 10 zur Behandlung rheumatischer Arthritis.

25 Hiezu 16 Blatt Zeichnungen

Fig. 1

ATG CAG GAC CCA TAT GTA AAA GAA GCA GAA AAC CTT AAG AAA TAT
(Met) Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr

1

TTT AAT GCA GGT CAT TCA GAT GTA GCG GAT AAT GGA ACT CTT TTC
Phe Asn Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe

TTA GGC ATT TTG AAG AAT TGG AAA GAG GAG AGT GAC AGA AAA ATA
Leu Gly Ile Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile

ATG CAG AGC CAA ATT GTC TCC TTT TAC TTC AAA CTT TTT AAA AAC
Met Gln Ser Gln Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn

TTT AAA GAT GAC CAG AGC ATC CAA AAG AGT GTG GAG ACC ATC AAG
Phe Lys Asp Asp Gln Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys

GAA GAC ATG AAT GTC AAG TTT TTC AAT AGC AAC AAA AAG AAA CGA
Glu Asp Met Asn Val Lys Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg

GAT GAC TTC GAA AAG CTG ACT AAT TAT TCG GTA ACT GAC TTG AAT
Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn

GTC CAA CGC AAA GCA ATA CAT GAA CTC ATC CAA GTG ATG GCT GAA
Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu Leu Ile Gln Val Met Ala Glu

Hinf I

CTG TCG CCA GCA GCT AAA ACA GGG AAG CGA AAA AGG AGT CAG ATG
Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys Arg Lys Arg Ser Gln Met

130

CTG TTT CGA GGT CGA AGA GCA TCC CAG TAA
Leu Phe Arg Gly Arg Arg Ala Ser Gln

143

Fig. 2

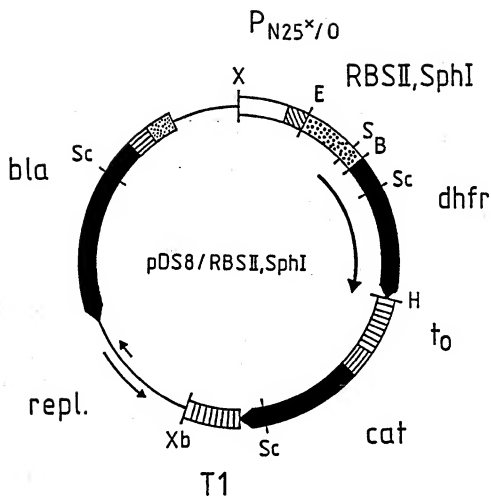


Fig.3

10 20 30 40 50

0 CCTCGAGGCT GGCATCCCTA ACATATCCGA ATGGTTACTT AAACAACGGA
50 GGACTAGCGT ATCCGTTCCG ATAGGGTTTG AGTTAGATAA ACTATATGCT
100 GAACCTTTCCT CTTTGCTCAA AGAATCATAA AAAATTTATT TGCTTTCAGG
150 AAAATTTTTT TCTATAATAG ATTCAAATTG TGACGGGATA ACAAATTTGAA
200 TTCATTAAG AGGAGAAATT AAGCATGCGA GGATCGGGCA TCATGGTTCC
250 ACCATTGAAC TGCATCGTCG CCGTGTCCTA AAATATGGGG ATTGCCAAGA
300 ACGGAGACCT ACCCCTGGCCT CCGCTCAGGA ACGAGTTCAA GTACTTCCAA
350 AGAATGACCA CAACCTCTTC AGTGGAAGGT AAACAGAATC TGCTGATTAT
400 GGGTAGGAAA ACCTGGTTCT CCATTCTCTA GAAGAATCGA CCTTTAAAGG
450 ACAGAAATTA TATAGTTCTC AGTAGAGAAC TCAAAGAACC ACCACGAGGA
500 GCTCATTTTT TTGCCAAAAG TTGGATGAT GCCTTAAGAC TTATTGAACA
550 ACCGGAATTG GCAAGTAAAG TAGACATGGT TTGGATAGTC GGAGGCAGTT
600 CTGTTTACCA GGAAGCCATG AATCAACCAG CCCACCTTAG ACTCTTTGTC
650 ACAAGGATCA TCCAGGAATT TGAAAAGTGAC ACGTTTTTCC CAGAAATTGA
700 TTTGGGGAAA TATAAAGTTG TCCCAGAATA CCGAGGCGTC CTCTCTGAGG
750 TCCAGGAGGA AAAAGCCATC AAGTATAAGT TTGAAGTCTA CGAGAAGAAA
800 QACTAACAGG AAGATGCTTT CAAGTTCTCT GCTCCCTCTC TAAAGCTATG
850 CATTTTTATA AGACCATGGG ACTTTTGCTG GCTTTAGATC CGGCCAAGCT
900 TGGACTCCTG TTGATAGATC CAGTAATGAC CTCAGAACCT CATCTGGATT
950 TGTTCAGAAC GCTCGGTTGC CGCGGGCGGT TTTTTATTGG TGAGAATCCA
1000 AGCTAGCTTG GCGAGATTTT CAGGACGTAA GGAAAGCTAAA ATGGAGAAAA
1050 AAATCACTGG ATATACCACC GTTGATATAT CCCAATGGCA TCGTAAAGAA
1100 CATTTTGAGG CATTTCACTC AGTTGCTCAA TGTACCTATA ACCAGACCGT
1150 TCAGCTGGAT ATTACGGGCT TTTTAAAGAG CGTAAAGAAA AATAAGCACA

Fig. 3 (cont.)

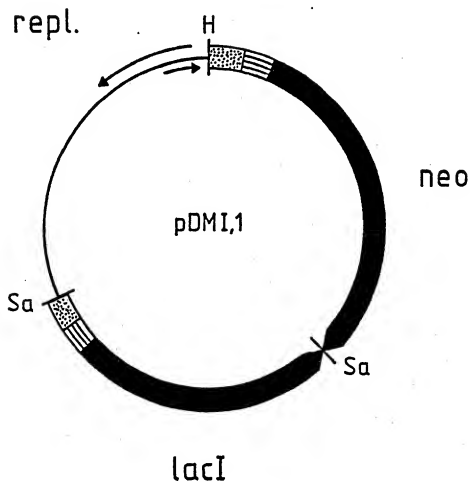
	10	20	30	40	50
1200	AGTTTTATCG	GGCCTTTATT	CACATTCTTG	CCGGCCTGAT	GAATGCTCAT
1250	CCGGAATTC	GTATGGCAAT	GAAAGACGGT	GAGCTGGTGA	TATGGGATAG
1300	TGTTACCCCT	TGTTACACCG	TTTTCCATGA	GCAAACTGAA	ACGTTTTTCAT
1350	GGCTCTGGAG	TGAATACCAC	GACGATTTC	GGCAGTTTCT	ACACATATAT
1400	TCGCAAGATG	TGGCGTGTTA	CGGTGAAAAC	CTGGCCTATT	TCCCTAAAGG
1450	GTTTATTGAG	AATATGTTTT	TCGTCTCAGC	CAATCCCTGG	GTGAGTTTCA
1500	CCAGTTTTGA	TTTAAACGTG	GCCAATATGG	ACAACTTCTT	CGCCCCCGTT
1550	TTCACCATGG	GCAAATATTA	TACGCAAGGC	GACAAGGTGC	TGATGCCGCT
1600	GGCGATTCTAG	GTTTCATCATG	CCGTCTGTGA	TGGCTTCCAT	GTGCGCAGAA
1650	TGCTTAATGA	ATTACAACAG	TACTGCGATG	AGTGGCAGGG	CGGGGCGTAA
1700	TTTTTTTAAG	GCAGTTATTG	GTGCCCTTAA	ACGCCCTGGG	TAATGACTCT
1750	CTAGCTTGAC	GCATCAAATA	AAACGAAAGG	CTCAGTCGAA	AGACTGGCCC
1800	TTTCGTTTTA	TCTGTTGTTT	GTGCGTGAAC	GCTCTCCTGA	GTAGGACAAA
1850	TCCGCCGCTC	TAGAGC			

2068

—pBR322—A

4358

Fig. 4



Ausgegeben

25. 11. 1991

Int. Cl.⁵: C12N 15/23

C12N 1/20

C12P 21/02

A61K 37/66

Blatt 6

Fig. 5

10 20 30 40 50
 0 AAGTTTCACG CTGCCGCAAG CACTCAGGGC GCAAGGGCTG CTAAGGAAG
 50 CGGAACACGT AGAAAGCCAG TCCGCAGAAA CGTGCTGAC CCGGATGAA
 100 TGTCAGCTAC TGGGCTATCT GGACAAGGGA AAACGCAAGC GCAAAGAGAA
 150 AGCAGGTAGC TTGCAGTGGG CTTACATGGC GATAGCTAGA CTGGGCGGTT
 200 TTATGGACAG CAAGCGAACC GGAATTGCCA GCTGGGGCGC CCTCTGGTAA
 250 GGTTGGGAAG CCTGCAAG TAACTGGAT GGCTTTCTTG CCGCCAAGGA
 300 TCTGATGGCG CAGGGGATCA AGATCTGATC AAGACACAGG ATGAGCATCG
 350 TTTCGGATGA TTGAACAAGA TGGATTGCAC GCAGGTTCTC CGGCCGGTTG
 400 GCTGGCAGAG CTATTCCGGT ATGACTGGGC ACAACAGACA ATCGGCTGCT
 450 CTGATGCGGC CGTGTTCGGG CTGTCAGGCG AGGGGCGGCC GATTCTTTTT
 500 GTCAAGACCG ACCTGTCCGG TGCCCTGAAT GAACTGCAGG ACGAGCGAGC
 550 CGGCGTATCG TGCGTGCCCA CGACGGGCGT TCCTTGCCCA GCTGTGCTCG
 600 ACGTTGTCAC TGAAGCGGGA AGGGAAGTGG TGCTATTGGG CGAAGTGGCG
 650 GGGCAGGATC TCCTGTCATC TCACCTTGCT CCTGCCGAGA AAGTATCCAT
 700 CATGGGTGAT GCAATGCGGC GGCTGCATAC GCTTGATCCG GCTACCTGGC
 750 CATTGACCA CCAAGCGAAA CATCGCATCG AGCGAGCAGC TACTCGGATG
 800 CAAGCCGGTC TTGTGATCA GGATGATCTG CACGAAGAGC ATCAGGGCT
 850 CGCGCCAGCC GAAGTTTCG CAGGCTCAA GGCGGCGATG CCGCAGCGGG
 900 AGGATCTCGT CGTGAGCCAT GCGGATGCTT GCTTCCGAA TATCATGGTG
 950 CAAAATGGCC GCTTTCTGG ATTCATCGAC TGTGGCCGGG TGGGTGTGG
 1000 CGACCGCTAT CAGGACATAG CGTTGGCTAC CCGTGATATT CCGAAGAGC
 1050 TTGGCGCGGA ATGGGCTGAC CGCTTCTCG TGCTTACGG TATCGCGCT
 1100 CGCGATTCCG AGGGCATGGC CTTCTATCGC CTTCTTGAGC AGTCTTCTG
 1150 AGCGGACTC TGCGGTTGCA AATGACCGAC CAAGCGACCG CCAACCTGCC
 1200 ATCACGAGAT TTGCATTCCA CCGCGGCTT CTATGAAAGG TTGGGCTTCG
 1250 GAATCGTTTT CCGGACCGC GGCTGGATGA TCCTCCAGCG CGGGGATCTC
 1300 ATGCTGAGT TCTTGGCCCA CCGCGGGTC GATCCCTCG CGAGTTGGTT
 1350 CAGCTGCTGC CTGAGGCTGG ACGACCTCGC CGAGTTCTAC CGGCAGTGCA
 1400 AATCCGCTCG CATCCAGAA ACCAGCAGCG GCTATCCGCG CATCCATGCC
 1450 CCCGAACTGC AGGAGTGGG AGGCACGATG CCGGCTTTGC TCGACAATTC
 1500 CGGCTAACTT ACATTAATTG CGTTGCGCTC ACTGCCCGGT TTCAGTTCGG
 1550 CAAACTGTG GTGCCAGCTG CATTAAATGAA TCGGCCAAGC CGCGGGGAGA
 1600 CGCGGTTTGC GTATTGGCG CGAGGCTGGT TTTCTTTTC ACCAGTGAGA
 1650 CGGGCAACAG CTGATTGCCC TTCACCGGCT GCGGCTGAGA GAGTTGCAGC
 1700 AAGCGGTCCA CGCTGGTTTG CCGCAGCAGG CGAAATCTCT GTTTGATGGT
 1750 CGTTAACGGC GGGATATAAC ATGAGCTGTC TTCGGTATCG TCGATCCCA
 1800 CTACCGAGAT ATCGGCACCA AGCGCAGCG CGGACTCGGT AATGGCGCG
 1850 ATTCCGCCCA CGGCGATCTG ATCGTTGCCA ACCAGCATCG CACTGGGAAC

Fig. 5 (cont.)

10 20 30 40 50
 1900 GATGCCCTCA TTCAGCATTT GCATCGTTTG TTGAAAACCG GACATGGCAC
 1950 TCCAGTGGCC TTCCCGTTCC GGTATCGGCT GAATTTGATT GCGAGTGACA
 2000 TATTTATGCC AGCCAGCCAG ACCGACAGCG GCCGAGACAG AACTTAATGG
 2050 CGCCGGTAAC AGCGCGATTT GCTGGTGACC CAATGCCGAC AGATGCTCCA
 2100 CGCCAGTCC CGTACCGTCT TCATGGGAGA AAATAATACT GTTGATGGGT
 2150 GTCTGGTCAG AGACATCAAG AAATAACGCC GGAACATTAG TGCAGCGAGC
 2200 TTCCACAGCA ATGGCATCCT GGTATCCAG CGGATAGTTA ATGATCAGCG
 2250 CACTGACCGG TTGCGCCAGA AGATTGTGCA CGCGCGGTTT ACAGGGTTGG
 2300 ACGGCGGTTT GTTCTACCAT CGACACCAGC ACGCTGGCAC CCAGTTGATC
 2350 GGCGCGAGAT TTAATCGCCG CGACAATTTG CGACGGCGCG TGCAGGGCCA
 2400 CACTGGAGGT GGCAACGCCA ATCAGCAACG ACTGTTTGCC CGCCAGTTGT
 2450 TGTGCCACCG GTTTGGGAAT GTAATTCAGG TCCGCCATCG CCGTTTCCAC
 2500 TTTTTCCCGG GTTTTCGCAG AAACGTGGCT GGCCTGGTTC ACCACGCGCG
 2550 AAACGGTCTG ATAAGAGACA CCGGCATACT CTGCGACATC GTATAACGTT
 2600 ACTGGTTTCA CATTCAACCAC CCTGAATTGA CTCTCTTCCG GGCCTATCA
 2650 TGCCATACCG CGAAAGGTTT TGCACCATTC GATGGTGCA ACGTAAATGC
 2700 ATGCCGCTTC GCCTTCGGC GCGAATGTC GACCTGTCC CTCCTGTTC
 2750 GCTACTGACG GGGTGGTGCG TAACGGCAAA AGCACCGCG GACATCAGCG
 2800 CTAGCGGAGT GTATACTGGC TTACTATGTT GGCACGTATG AGGGTGTCA
 2850 TGAAGTGCTT CATGTGGCAG GAGAAAAAAG GCTGCACCGG TGCCTCAGCA
 2900 GAATATGTGA TACAGGATAT ATTCCGCTTC CTCGCTCAGT CACTCGGTAC
 2950 GCTCGGTCTG TCGACTCGCG CGAGCGGAAA TGGCTTACGA ACGGGCGGGA
 3000 GATTTCCCTGG AAGATGCCAG GAAGATACTT AACAGGGAAG TGAGAGGGCC
 3050 CGGGCAAAAG CGTTTTTGCA TAGGCTCCGC CCGCCTGACA AGCATCACGA
 3100 AATCTGACGC TCAAATCAGT GGTGGCGAAA CCGGACAGGA CTATAAAGAT
 3150 ACCAGCGGTT TCCCTGGCG GCTCCCTCGT CGGCTCTCCT GTTCCCTGCC
 3200 TTGGGTTTAC CGGTGTCATT CCGCTGTTAT GCGCGCGTTT GTCTCATTCG
 3250 ACGCCTGACA CTCAGTTCGG GGTAGGCAGT TCGCTCCAAG GTGGACTGTA
 3300 TGCACGAACC CCGCGTTTCA TCCGACCGCT GCGCCTTATC GGGTAACTAT
 3350 CGTCTTGAGT CCAACCCGGA AAGACATGCA AAAGCACAC TGGCAGCAGC
 3400 CACTGGTAAT TGATTTAGAG GAGTTAGTCT TGAAGTCATG CGCCGGTTAA
 3450 GGGTAACCTG AAAGGACAAG TTTTGGTGAC TCGGCTCCTC CAAGCCAGTT
 3500 ACCTCGGTTT AAAGAGTTGG TAGCTCAGAG AACCTTGGA AAACCGCGCT
 3550 CGAAGGCGGT TTTTTCGTTT TCAGAGCAAG ACATTACGGG CAGACCAAAA
 3600 CGATCTCAAG AAGATCATCT TATTAATCAG ATAAAAATT TCTAGATTTT
 3650 AGTGAATTT ATCTCTTCAA ATGTAGCACG TGAAGTCAGC CCCATACGAT
 3700 ATAAGTTGTT AATTCTCATG TTTGACAGCT TATCATCGAT

Fig. 6

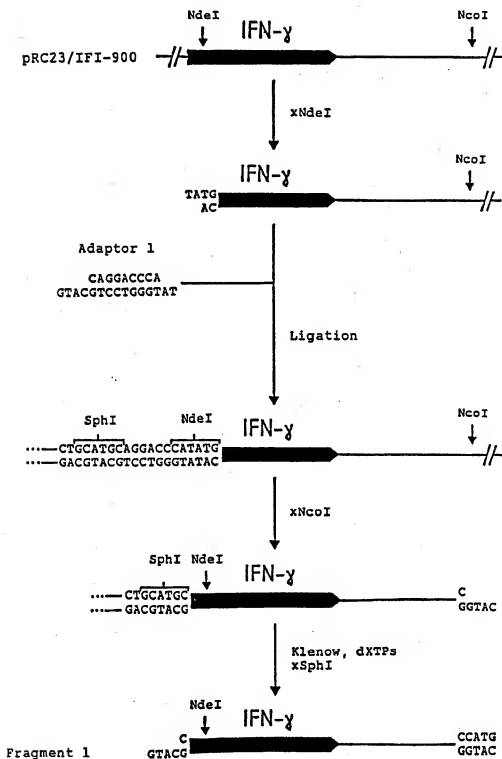
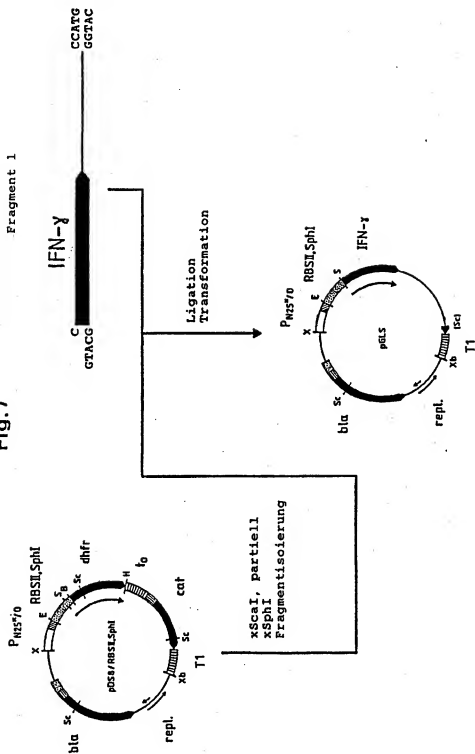


Fig. 7



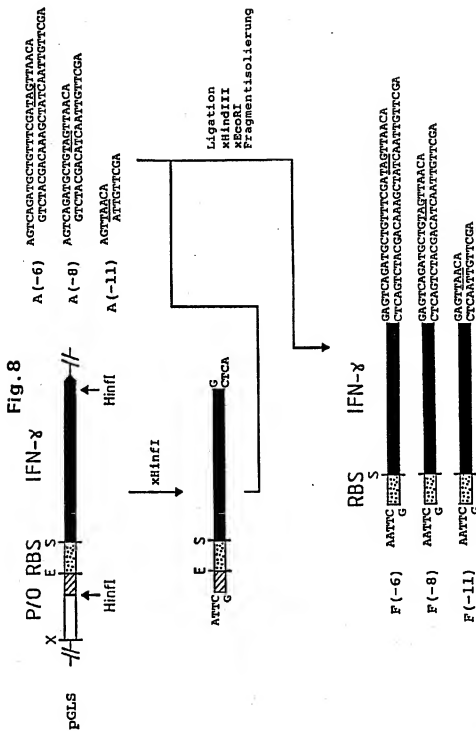


Fig.9

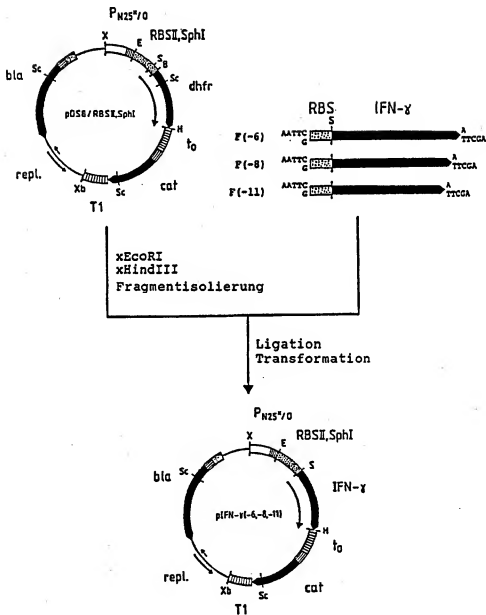


Fig. 10

rIFN- γ	Met-(130aa)-ArgSerGlnMetLeuPheArgGlyArgAlaSerGln
IFN- γ (-6)	Met-(130aa)-ArgSerGlnMetLeuPheArg
IFN- γ (-7)	Met-(130aa)-ArgSerGlnMetLeuPhe
IFN- γ (-8)	Met-(130aa)-ArgSerGlnMetLeu
IFN- γ (-9)	Met-(130aa)-ArgSerGlnMet
IFN- γ (-10)	Met-(130aa)-ArgSerGln
IFN- γ (-11)	Met-(130aa)-ArgSer

[aa = AMINOSÄUREN]

Fig. 11a

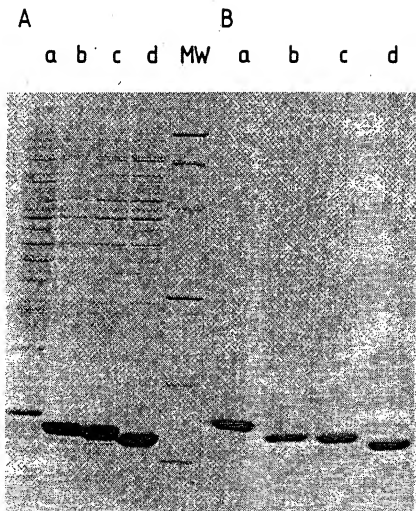


Fig.11b

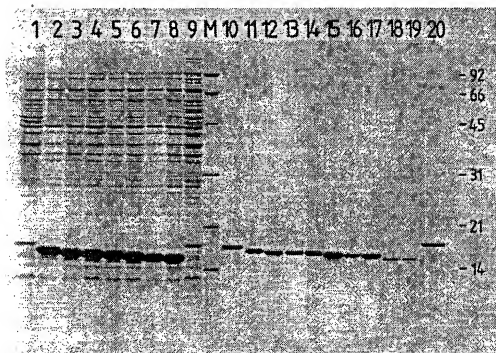


Fig.12

Antivirale Aktivität

$\times 10^7$ U/mg

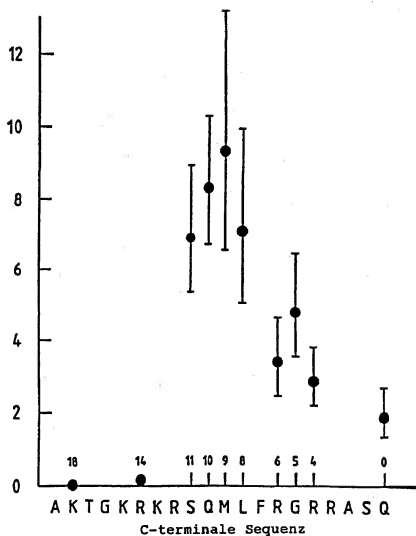


Fig. 13

